



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

CXCR4와 GPCR-X family 사이의
상호작용에 대한 연구

Discovering interaction between
CXCR4 and GPCR-X family

2018년 6월

서울대학교 대학원

생명과학부

박 창 성

초 록

Stromal-derived factor 1 α 라고도 불리는 케모카인 (Chemokines) CXCL12는 G-protein coupled receptor (GPCR)의 하나인 CXCR4에 리간드로 작용하여 CXCR4를 발현하는 정상 세포들의 migration과 homing을 유도한다. 그러나 이러한 반응은 암세포의 전이 (metastasis)에 있어서도 필수적인 과정인데, 계속되는 보고들에 의하면 다양한 종류의 암세포에서 CXCL12와 CXCR4가 과발현되고 있으며 여러 신호 전달 통로를 이용하여 암세포의 proliferation, migration, invasion에 관여한다고 한다. 그렇기에 이러한 CXCR4를 저해하려는 시도들은 꾸준히 있어왔으나 CXCR4의 직접적 저해는 cardiac dysfunction을 포함한 많은 부작용을 일으켰다.

따라서 우리 연구실은 CXCR4의 또다른 저해 방법으로 GPCR의 대표적 특징 중 하나로 알려져 있는 중합체 형성에 주목하였다. 이분자 형광 상보 기법 (BiFC assay)을 이용하여 CXCR4와 중합체를 형성하는 것으로 보이는 후보들을 1차적으로 추려내었고, 이 중 한 가지인 신경펩타이드 X 수용체를 골라 후속 실험을 진행하였다. BiFC로 GPCR-X의 세 가지 family 구성원까지 실험한 결과 양상의 차이는 있었지만 모두에서 positive한 반응이 나타났다. 이어서 진행한 co-internalization assay에서는 BiFC 데이터와 부합하는 결과를 얻었는데, 특이하게도 GPCR-X family에 특이적인 리간드 처리만으로도 CXCR4의 internalization이 유도되었으며 그 양상이 GPCR-X family와 일치하였다. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay에서도 CXCR4와 GPCR-X family 사이의 중합체 형성을 확인하였다. 특히 Cal-520[®]을 이용한 세포 내 칼슘 농도를 측정 실험에서는 두 가지 GPCR을 과발현시킨 후 양쪽의 리간드를 처리 시 칼슘 이온의 총량에서 현저한 증가를 확인하였다. 또한 두 가지 GPCR에 특이적으로 작용하는 antagonist를 처리하였을 때 그러한

세포 내 칼슘 농도의 증가도 사라졌다. 이 실험 결과들을 종합하면 CXCR4와 GPCR-X family가 중합체를 형성하며, 이에 따른 세포 내 신호 전달의 변화가 수반되고 있음을 알 수 있다. 따라서 부작용을 동반하는 직접적인 CXCR4의 저해 없이도 상호작용하는 GPCR을 allosteric modulator로서 활용하여 간접적 저해가 가능할 것임을 암시한다.

주요어: CXCR4, CXCL12, GPCR heteromerization, BiFC, Co-internalization assay

목차

초록	i
목차	iii
그림 목차	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	10
III. 결과	16
IV. 고찰	45
V. 참고문헌	50
Abstract	54

그림 목차

그림 1. CXCR4와 GPCR-X family의 발현.....	18
그림 2. BiFC를 이용하여 관찰한 CXCR4와 GPCR-X family의 중합체 형성.....	20
그림 3. CXCR4와 GPCR-X family의 BRET net ratio.....	23
그림 4. 선택적 리간드를 이용한 CXCR4와 GPCR-X1의 co-internalization assay.....	25
그림 5. 선택적 리간드를 이용한 CXCR4와 GPCR-X2의 co-internalization assay.....	27
그림 6. 선택적 리간드를 이용한 CXCR4와 GPCR-X3의 co-internalization.....	28
그림 7. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-X1 사이의 synergistic 상호작용.....	33
그림 8. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-X2 사이의 synergistic 상호작용.....	35
그림 9. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-X3 사이의 synergistic 상호작용.....	36
그림 10. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-Y 사이의 상호작용.....	37
그림 11. CXCR4, GPCR-X1 선택적 antagonist 처리 후 관찰한 synergistic effect의 변화.....	39
그림 12. CXCR4, GPCR-X2 선택적 antagonist 처리 후 관찰한 synergistic effect의 변화.....	441
그림 13. CXCR4, GPCR-X3 선택적 antagonist 처리 후 관찰한 synergistic effect의 변화.....	43

I. 서론

1. 연구 배경

1.1. SDF-1/CXCR4 신호 전달

케모카인 (Chemokines)은 8-10 kDa의 크기를 갖는 저분자 단백질로, 가장 큰 특징 중 한 가지는 백혈구, 호중구, 단핵구, 내피세포 등 여러 종류의 세포에 걸쳐 주화성 (chemotaxis)을 일으킨다는 것이다. (Viola A et al. 2008). 이러한 케모카인은 N-말단에서 발견되는 시스테인 (Cysteine) 잔기에 따라 CXC, CC, C, CX3C의 네 가지로 구분되는데, CXC 케모카인과 CX3C 케모카인은 각각 두 개의 시스테인기 사이에 임의의 아미노산 1개와 3개를 가지며 C 케모카인은 시스테인기가 단일로 존재, CC 케모카인은 두 개의 시스테인기가 연속으로 존재하는 특징을 가진다 (Balkwill F. 2004).

CXCR4는 7회막관통 G단백질공역형 수용체 (7-transmembrane G protein coupled receptor, GPCR)로 네 가지 케모카인 중에서 CXC 케모카인에 속하는 CXCL12을 리간드로 갖는데, 이는 Stromal cell derived factor-1 (SDF-1)로 불리기도 한다. CXCR4는 많은 종류의 암에서 발현되는 것이 보고되었는데, 이에 선택적으로만 결합하는 CXCL12은 CXCR4/CXCL12 복합체를 형성하여 세포 내 칼슘 농도의 증가, 세포 생존, proliferation, 유전자 전사, 세포 부착 등 여러 가지의 하위 signaling pathway를 활성화시키는 것으로 알려져 있다 (Bleul et al. 1996). 그 중에서도 CXCL12은 골수 (bone marrow)에서 높은 농도로 발현되는데, 조혈모세포나 혈구세포처럼 CXCR4를 고농도로 발현하는 세포들을 골수로 이동하도록 유도하는 케모카인으로서의 역할을 한다. 이와 유사한 방식으로 고농도의 CXCR4를 갖는 암세포들은 그러한 특성에 따라 타 조직에서 발현되는 CXCL12을 따라 암세포의 전이가 일어나게 된다 (Lieberman J et

al. 2012).

그 후 CXCR4를 직접적으로 저해함으로써 암세포의 전이를 막으려는 연구가 많이 진행되어 왔는데, CXCR4에 선택적으로 작용하는 antagonist인 AMD3100이 그 예이다 (De Clercq E1. 2009). HIV 치료제 개발중에 발견된 AMD3100은 임상실험 도중 혈중 내 조혈모세포의 양을 증가시키는 부작용을 일으켰다. 연구결과 AMD3100은 CXCR4/CXCL12 상호작용을 통한 조혈모세포가 골수 내에 머물도록 하는 (homing) 작용을 CXCR4를 저해함으로써 무너트렸다. 따라서 CXCR4 저해 특성을 이용한 암세포 전이 치료제로서 AMD3100은 골수 내 조혈모세포의 유지 상태를 깨트릴 뿐만 아니라 cardiac dysfunction 등의 부작용이 보고되어 실험이 중지되었으며, 조혈모세포 이식을 위한 혈중 조혈모세포 수집용으로만 의약품 사용허가가 승인되었다. (Dai S et al. 2010). 이에 따라 생체 내에서 CXCR4를 저해하기 위한 다른 방법에 대한 필요성이 부각되고 있다.

1.2. GPCR 사이의 상호작용

CXCR4의 다양한 암에서의 발현 양상과 SDF-1/CXCR4 axis로 야기되는 암세포의 전이 현상을 조절하는 기작의 중심에 CXCR4가 존재하는 것은 여러 연구되서 계속해서 입증되고 있기에 기존 연구에서 진행해오던 직접적인 제재 외에 다른 방법으로 조절할 필요가 있다. GPCR은 여러 가지 특징을 지니고 있는데, 대표적 특징 중 하나는 heterotrimeric G proteins [G_{α} (G alpha), G_{β} (G beta), G_{γ} (gamma)]와의 상호작용을 통한 신호전달이다. 또 하나는 세포막을 일곱 번 통과하는 7-transmembrane α -helices들을 이용하여 동일한 GPCR과 동형이합체(homodimer)를, 다른 종류의 GPCR과는 이형이합체(heterodimer)를 형성하기도 한다는 것이다. 경우에 따라서는 이합체보다 더욱 복잡한 중합체

(oligomer)를 이루기 때문에 그 조합은 매우 다양하다 (Mellado et al. 2001). 이전부터 이러한 GPCR의 이합체 및 중합체의 형성 특성을 이용하여 상호작용하는 GPCR을 우회적으로 조절하려는 allosteric modulator로서의 GPCR의 개념이 꾸준히 제기되어 오고 있다 (Haack KK et al. 2011).

1.3. 신경펩타이드 X와 그 수용체의 특성 (레퍼런스 단축화)

신경펩타이드 (neuropeptide) X는 소수성 C-말단에 특정 아미노산 집단을 공통적으로 가지는 신경전달물질의 일종으로 X는 소수성 방향족이나 지방족 아미노산이 차지하며 이는 신경펩타이드 X의 종류에 따라 달라지고 수용체 활성화에 있어 필요하다 (N. 2005). 신경펩타이드 X가 작용하는 수용체 *homo sapiens*에 총 3가지가 존재하는데, GPCR-X1, GPCR-X2, GPCR-X3로 GPCR 신경펩타이드 X 수용체군을 이루고 있다. GPCR-X에 리간드로 작용하는 *homo sapiens* 내 신경펩타이드 X는 3종류가 있으며, GPCR-X1, GPCR-X2에 특이적으로 결합하는 신경펩타이드 X1, X2는 동일한 유전자로부터 alternative RNA splicing과 precursor protein의 processing에 의해 만들어진다. GPCR-X3에 특이적으로 결합하는 신경펩타이드 X3는 다른 유전자로부터 만들어진다.

GPCR이 desensitization이 일어나기 위해서 β -arrestin은 먼저 수용체의 cytoplasmic 방향에 붙어서 G protein들과의 상호작용을 막는다. 그 후 clathrin과 clathrin adapter AP2 등 internalization machinery을 불러와서 coated pits을 형성하며 세포 안쪽으로 들어와 endosome을 만들게 된다 (M. et al. 2007). 활성화된 GPCR-X family도 clathrin-mediated endocytosis를 통해 internalization이 일어나며, GPCR-X1의 경우 동시에 β -arrestin이 신호 전달 단백질까지 recruit하여 Src, MEKK, and ERK1/2과 함께 signaling complex (signalosome)를 형성하여 endosome 상태에서도 지속적으로 신호를 전달한다고 한다 (D. et al. 2000). 이제까지 보고된 바에 의하면 GPCR-X1은 동형중합체를 형성하지 않으며 세포막 표면에 존재한다고 한다 (M. et al. 2006).

한편, GPCR-X family는 신경계와 관련된 연구가 주를 이루었었는데 최근에는 암과의 연관성이 많이 보고되고 있다. Neural Cancer (M. et al. 2007)나 대장암 (R. et al. 2008)에서도 autocrine 신호에 의한 암세포의 성장이 보고되었다.

뿐만 아니라 췌장암, 유방암, 폐암, 피부암 등에서도 GPCR-X family의 과발현이 되었다 (S. et al. 2000; L. et al. 2006). 이같은 연구들에 따라 GPCR-X family에 특이적으로 작용하는 antagonist처럼 GPCR의 활성을 저해함으로써 항암치료의 효율을 증가시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

1.4. 단백질-단백질 상호작용

단백질-단백질 사이의 상호작용을 확인하는 데에는 Tandem affinity purification-mass spectroscopy (TAP-MS), 공동면역침전 분석 (Coimmunoprecipitation), BiFC와 같은 Protein-fragment complementation 등 다양한 방법이 있다 (Rao et al. 2014). 본 연구는 이같은 방법 중에서 이분자 형광 상보 기법 [BiFC], 공동 내재화 [Co-internalization], 생체발광 공진 에너지 전달 [BRET]을 사용하였다.

BiFC assay는 먼저 EGFP, EYFP, mCherry, Venus 등 여러 종류의 형광 단백질을 두 개로 분리하여 상호작용을 조사하고자 하는 양 쪽의 단백질에 연결시킨다. 본 연구의 경우 두 수용체가 서로 상호작용이 가능할만큼 가까운 거리 (약 100 Å) 이내에 위치하게 되면, 쪼개져 있을 때에는 형광을 내지 못하는 형광 단백질의 두 파편이 다시 하나의 형광 단백질로 합쳐져 형광을 관찰할 수 있게 된다 (Miller KE, Kim Y. et al. 2015).

Co-internalization assay는 internalization assay를 기반으로 하는데, 경우에 따라서 개수의 차이는 있지만 현미경을 통해 눈으로 인지할 수 있는 1~2개의 형광 단백질을 조사하고자 하는 GPCR들에 tagging하여 시작한다. Internalization assay는 GPCR의 또 다른 특징 중 하나를 이용하는데, ligand에 의해 활성화될 경우 G protein-coupled receptor kinases (GRKs)에 의하여 인산화된 후 β -arrestin을 recruit하여 일련의 단계를 거치며 internalization되는 것이

그 특징이다. GPCR이 ligand에 의해 활성화되기 이전에 세포막 표면에서 관찰되던 형광 단백질들이 ligand-induced activation 이후 clathrin으로 둘러싸여 vesicle을 형성한 후 점점 세포 안쪽으로 들어가는 모습을 볼 수 있다. Co-internalization assay는 이것을 조금 더 응용한 것으로 excitation/emission 파장대가 겹치지 않는 RFP/GFP나 YFP/CFP 등 두 개의 형광 단백질 세트를 각각의 GPCR에 tagging하여 실험 진행 양상을 이중으로 체크할 수 있는 장점이 있다 (Alonso N et al. 2013).

BRET 또한 물질 사이의 거리에 반응하는 실험 기법으로 주로 두 가지 단백질 간의 상호작용을 확인하는데 사용된다. 한 쪽에는 각각 Renilla luciferase와 그 유도체들을 donor를 연결하고, 상호작용을 확인하려는 다른 쪽에는 EYFP, GFP, DsRed등 acceptor를 연결한다. Donor에 대표적 substrate 중 하나인 coelenterazine이 존재하면 donor에 의해 catalytic degradation 되면서 에너지가 방출된다. 이 때 형광 단백질들이 주로 acceptor로 사용되는데, 약 10 nm 가까이 다가오게 되면 acceptor는 그 에너지에 의해 excitation 되었다가 다시 emission 시키면서 형광 현미경으로 관찰이 가능해진다 (Dasiel O et al. 2014).

각각의 실험들은 두 물체, 특히 두 단백질이 매우 근접한 곳에 위치하며 상호작용 하는지의 여부를 판별하는 실험으로 쓰인다. 그러나 수용체의 발현 위치, 발현 정도, 리간드의 처리에 따른 변화, 수치화의 가능 여부 등 파악할 수 있는 정보는 실험의 특성에 따라 다르다. 따라서 세 가지 실험에서 얻어지는 결과들을 다양한 각도의 측면에서 종합한다면 여러 GPCR 사이에 중합체 형성 여부를 더욱 확실하게 알 수 있다 (Kocan M., Pfleger K.D.G. 2011).

1.5. 칼슘 농도

칼슘 이온은 우리 몸에서 다양한 역할을 수행하는데, 다른 단백질 결합함으

로써 구조를 변형시켜 활성을 조절하기도 하고 세포의 흥분성, 외포작용, 이동성, 세포 사멸, 전사 등의 신호를 전달하는 2차전달자 역할도 수행한다 (Clapham. 2007). CXCR4는 CXCL12에 의해 활성화될 경우 G beta-gamma protein complex ($G_{\beta\gamma}$)를 통해 칼슘 이온 농도의 변화를 나타낸다는 것이 알려져 있으며 (Princen K et al. 2003), GPCR-X family에 속한 GPCR들은 모두 $G_{\alpha q}$ 단백질과 상호작용하는데 이들은 칼슘을 통한 신호 전달을 특징으로 가지므로 CXCR4와 GPCR-X가 상호작용할 경우 칼슘 이온 농도가 어떤 양상으로 변화하는지 알아보고자 하였다.

칼슘 이온 농도의 측정에는 Cal-520[®] dye를 사용하는데, 이는 fluorescent calcium indicator로 세포질의 calcium과 결합하여 490 nm의 광원으로 excitation 시 520 nm의 emission을 내보내 측정이 가능하도록 해준다 (Lock JT et al., 2015). Adenovirus를 이용하여 CXCR4와 GPCR-X family의 GPCR들을 mammal cell 내에서 과발현 시켜준 후 이형중합체를 형성하였을 때와 홀로 존재하였을 때 signaling이 어떤 양상을 띄게 되는지를 관찰한다.

2. 연구 목표

이 연구는 케모카인 리셉터 CXCR4와 GPCR-X family를 구성하는 세가지 수용체 GPCR-X1, GPCR-X2, GPCR-X3 사이에서 이형중합체가 형성되는지를 다양한 단백질-단백질 상호작용 실험 방법을 통하여 밝히고, 이형중합체 형성에 따른 세포 내 신호 전달의 변화를 확인하고자 한다.

첫 번째 세부적인 목표는 GPCR의 발현 양상에 따라서 동형 / 이형 중합체 형성의 유무 및 양상의 변화를 BiFC assay나 Co-internalization assay를 통하여 가시적으로 확인하는 것이다. 이와 같은 형광 단백질을 통한 관찰은 BRET assay처럼 수치 및 결과값만 얻을 수 있는 실험을 보조할 수 있다. 또 다른

목표는 두 가지 GPCR의 상호작용이 존재한다면, 어느 쪽의 리간드에 의해 활성화되는지가 중합체의 형성에 영향을 미치는지 알아보는 것이다. 또한 중합체 형성에 따른 세포 내 신호 전달의 변화를 칼슘 이온을 중심으로 Cal-520 dye를 이용, 수치화하여 나타내고자 한다. 또한 더 나아가 두 GPCR이 형성하는 중합체를 활용하여 GPCR-X에 선택적으로 작용하는 agonist 또는 antagonist를 투여함으로써 CXCR4을 간접적으로 조절할 수 있음을 밝히고자 한다.

이전까지 이합체를 매개체로 타겟 GPCR을 조절하는 allosteric modulator로서의 연구는 많이 진행되지 않았기에 CXCR4뿐만 아니라 현재 연구되고 있는 다양한 GPCR들을 좀 더 넓은 시각에서 볼 수 있는 계기가 될 것으로 기대한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

MDA-MB-231 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서, HEK293A 세포는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구매하였다. HEK293A 세포는 재조합 adenovirus의 복제에 필요한 단백질을 생산하는 *E1* 유전자가 삽입된 세포이다 (Kovesdi et al. 2010). HEK293A는 충분한 양의 바이러스를 확보하는 것과 형질주입 (transfection)을 통해 GPCR들을 발현시키는 목적으로 사용하였다. CXCR4를 많이 발현하는 것으로 알려진 MDA-MB-231에는 *E1* 유전자가 없어서 adenovirus를 GPCR들을 발현시키는 carrier로서만 사용하였다 (Helbig et al. 2003). 293A는 DMEM (HyClone, USA) 세포배양액, MDA-MB-231은 McCoy's 5A 세포배양액을 사용하였다. 양쪽 모두에 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone, USA), 100 units/ml의 페니실린, 100 g/ml의 스트렙토마이신을 추가하였으며 모든 세포들은 37°C, 5% CO₂조건의 인큐베이터에서 배양하였다.

2. Gateway system

Gateway cloning system은 다양한 cDNA를 이용하여 빠르고 쉬운 클로닝을 가능하게 하면서도 제한효소 (restriction) 부위가 필요하지 않다는 장점이 있다. 이 방법에는 GPCR의 발현을 위한 cDNA를 삽입한 entry vector와, backbone이면서 원하는 형광단백질까지 삽입할 수 있는 destination vector를 필요로 한다. Destination vector는 pcDNA3.1(+) (Invitrogen)을 사용하였다. Gateway cloning system에 사용할 destination vector는 attR 재조합 사이트와, 선택 마커로써 대부분의 *E. coli*의 gyrase에 작용하여 세포를 죽이는 *ccdB* 유전자를 가지고 있어야 한다. 본 실험에서는 이에 많은 *E. coli* strain 중에서

CcdB에 저항성을 갖는 db3.1을 사용하였다.

3. 재조합 플라스미드 제작

실험에 사용된 entry 벡터들은 특정 GPCR의 cDNA를 PCR을 이용하여 증폭시킨 뒤에 정제하여 pENTR/D-TOPO cloning kit (Invitrogen)로 제작하였으며 destination vector는 pcDNA3.1에 mEGFP-N1, mScarlet-N1 벡터를 Sequence- and ligation- independent cloning (SLIC)을 이용하여 삽입하여 만들었다 (Jeong JY et al. 2012).

실험에서 사용된 GPCR-X 수용체는 모두 *homo sapiens* 유래이다. 발현이 되는가의 유무와 세포 내 발현 위치의 확인, 그리고 그러한 발현 위치가 동일한 지점인가를 확인하는 co-localization 실험에는 GFP와 RFP 형광을 이용하였다. 이에 필요한 형광 단백질을 GPCR-X 수용체에 붙여주기 위하여 GPCR-X의 cDNA를 포함한 entry vector와, SLIC으로 제작한 pcDNA_dest_mEGFP 벡터와 pcDNA_dest_mScarlet 벡터를 LR recombination 하였다. BiFC 실험을 위해서 사용한 재조합 플라스미드는 위에서 사용한 entry vector와, 가까운 거리에서 합쳐질 수 있는 형광 단백질 venus의 조각들을 SLIC으로 삽입한 pcDNA_dest_VC155와 pcDNA_dest_VN173 사이의 LR recombination을 이용하였다. 모든 플라스미드는 GeneAll Miniprep kit를 이용하여 정제하였으며 DNA Sequencing을 통해서 올바른 시퀀스인지를 확인하였다.

4. 재조합 Adenovirus 생산

Adenovirus 생산을 위한 재조합 플라스미드는 GPCR cDNA를 가지고 있는 entry clone과 pAd/CMV/V5-Dest (Invitrogen)을 LR recombination 해준 후 Top10 competent cell을 이용하여 복제 및 정제한 후에 T7 promoter (TAATACGACTCACTATAGGG)와 V5-R (ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT) 프라이머를 이용하여 DNA Sequencing을 통해 시퀀스를 확인하였다. 이 플라스미드들을 6-well plate에 3×10^5 cells/well개의 HEK293A를 seeding한지 24시간 후 Lipofectamine 2000을 이용하여 형질 도입하였다. 약 80% 정도의 cytopathic effect (CPE)가 나타날 때까지 관찰하다가 pipetting을 통하여 모두 떼어낸 후 freezing-thawing을 3번 반복하여 cell lysis를 일으켰다. 그 후 3000 RPM에서 5 분간 cell down시켜 상층액을 얻은 후에 그 상층액을 100 mm dish로 scale-up 한 cell에다가 transduction 해줌으로써 더욱 많은 양의 바이러스를 얻어내었다. Adenovirus의 정량은 real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time qPCR)을 이용하였다.

5. 이분자 형광 상보 기법 (BiFC)

8×10^3 cells/well이 되도록 HEK293A를 96 well black clear bottom plate (Corning Costar, 3340: Corning® 96Well CellBIND® Microplates, clear flat bottom, black polystyrene, sterile, lid)에 준비하였다. Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific)가 제공한 실험 방법대로 진행하였으며 LR recombination을 통해 만들어진 pcDNA_CXCR4_VN173, pcDNA_CXCR4_VC155와 각 3개의 pcDNA_GPCR-X_VN173, pcDNA_GPCR-X_VC155 벡터를 형질 도입하였다. DNA 농도는 각 100 ng/ul이 되도록 정량해주었다.

6. Co-internalization assay

BiFC 실험과 동일하게 96 well black clear bottom plate (Costar)에 8×10^3 cells/well의 HEK293A cell을 깔아주었다. 여기에 각 100 ng/ul의 pcDNA_CXCR4_mEGFP와 pcDNA_GPCR-X_mScarlet을 형질 주입해주었다. 도입 24시간 후 In Cell Analyzer[®] 2000 (GE healthcare)을 이용하여 형광이미지를 얻어내었다.

7. In cell analyzer[®] 2000(GE healthcare)

형질 도입 후 24시간이 되었을 때 In cell analyzer[®] 2000을 사용하여 형광 이미지를 촬영하였다. 본 실험에 사용한 이미지는 200배 배율로 촬영하였으며 한 well에서 랜덤하게 8개의 포인트를 정하여 BiFC 실험의 경우 EYFP 필터를, Co-internalization 실험의 경우 EGFP, TexasRed 필터를 이용하였다.

8. Calcium assay

1일차에 2×10^4 cells/well의 MDA-MB-231 cell을 96 well black clear bottom plate (Costar)에 seeding한 후 24시간 후인 2일차에 Adenovirus를 이용한 transduction을 하였다. 실험 디자인에 따라 한 well당 총 40 MOI의 Adenovirus가 들어가도록 양을 계산하였다. 48시간동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였고

assay buffer (HBSS + 0.1% BSA + 20 mM HEPES)로 wash해준 후 4.46 ug/ml 농도의 Cal-520[®] AM (AAT Bioquest, Inc)을 이용하여 2시간동안 staining하였다. 다시 assay buffer를 이용하여 3번의 wash를 거쳐서 30분간 incubation 하였다. 그

후 FlexStation[®] 3 Multi-Mode Microplate Reader를 사용하여 detection하였다. 그래프와 통계처리는 GraphPad Prism 5를 이용하였다.

III. 결과

1. CXCR4와 GPCR-X family의 발현

CXCR4와 GPCR-X family의 상호작용을 살펴보기 이전에 HEK293A에서의 발현과 세포 내의 발현 위치를 살펴보았다. 세포 내로의 도입 방법으로는 Lipofectamine 2000[®]을 이용하였는데, LR recombinaotion을 통하여 CXCR4에는 mEGFP를, GPCR-X family에는 mScarlet을 C말단에 연결하는 재조합 플라스미드가 사용되었다. 그림 1에서 확인할 수 있듯이 CXCR4, GPCR-X1, 그리고 GPCR-X3는 HEK293A 세포 표면에서 발현되고 있었으며 GPCR-X2는 세포 내에서 다수의 granule을 형성하고 있는 것이 관찰되었다.

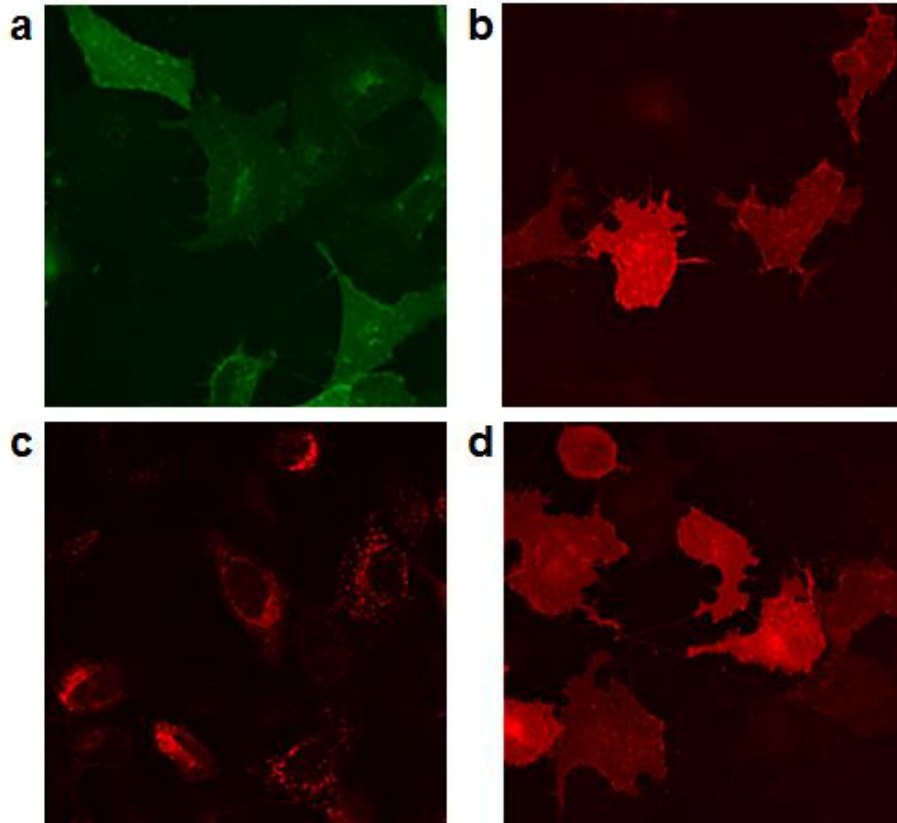


그림 1. CXCR4와 GPCR-X family의 발현.

LR recombination을 통하여 CXCR4에는 mEGFP를, GPCR-X family에는 mScarlet을 연결하였으며 HEK293A에 Lipofectamine[®] 2000으로 형질 도입한지 24시간이 되었을 때 In Cell Analyzer 2000[®]을 이용하여 100배로 촬영하였다. CXCR4 (a), GPCR-X1 (b), GPCR-X3 (d)는 세포막에서 발현되고 있으며 GPCR-X2 (c)는 intracellular domain에서 발현되고 있다.

2. CXCR4와 GPCR-X family 사이의 중합체 형성

단백질-단백질 사이의 상호작용을 관찰하는 데에는 BiFC, Proximity ligation assay (PLA), Co-immunoprecipitation assay (Co-IP), Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) 등 다양한 방법이 있는데 본 연구에서는 BiFC와 Co-immunoprecipitation assay, 그리고 BRET을 사용하였다.

2.1 BiFC로 살펴 본 homomer 및 heteromer 형성

본격적인 실험에 앞서 이전에 homomer를 형성한다고 알려진 CXCR4와 DRD2를 양성 대조군으로, CXCR4-DRD2 사이의 상호작용은 음성 대조군으로 사용하였다. CXCR4 사이의 homomer는 DRD2 사이의 homomer보다 강한 발광을 보였으며 이와 대조되게 음성 대조군으로 사용한 CXCR4-DRD2는 VN-VC의 위치가 관여하는 topology에 상관없이 venus 형광 단백질의 형성이 거의 나타나지 않았다 (그림 2a).

이어서 CXCR4와 GPCR-X family 사이의 16개 조합을 테스트한 결과는 크게 3가지로 구분되었다. 첫 번째는 세포 표면에서 homomer를 형성하는 CXCR4, GPCR-X1, GPCR-X3에 이어서 CXCR4-GPCR-X1, CXCR4-GPCR-X3는 heteromer를 이루었다. 두 번째는 GPCR-X2의 경우인데, GPCR-X2는 homomer는 물론 CXCR4, GPCR-X1, GPCR-X3와도 상호작용을 하는 것으로 보이지만, 세포막 내에서 발현하던 본인의 localization을 따라 BiFC 결과도 이와 동일한 위치에서 발견하였다. 마지막으로 GPCR-X1은 homomer를 형성하지 않았는데 이는 다른 연구에서 확인한 바와 같은 결과였다 (M. et al. 2006) (그림 2b).

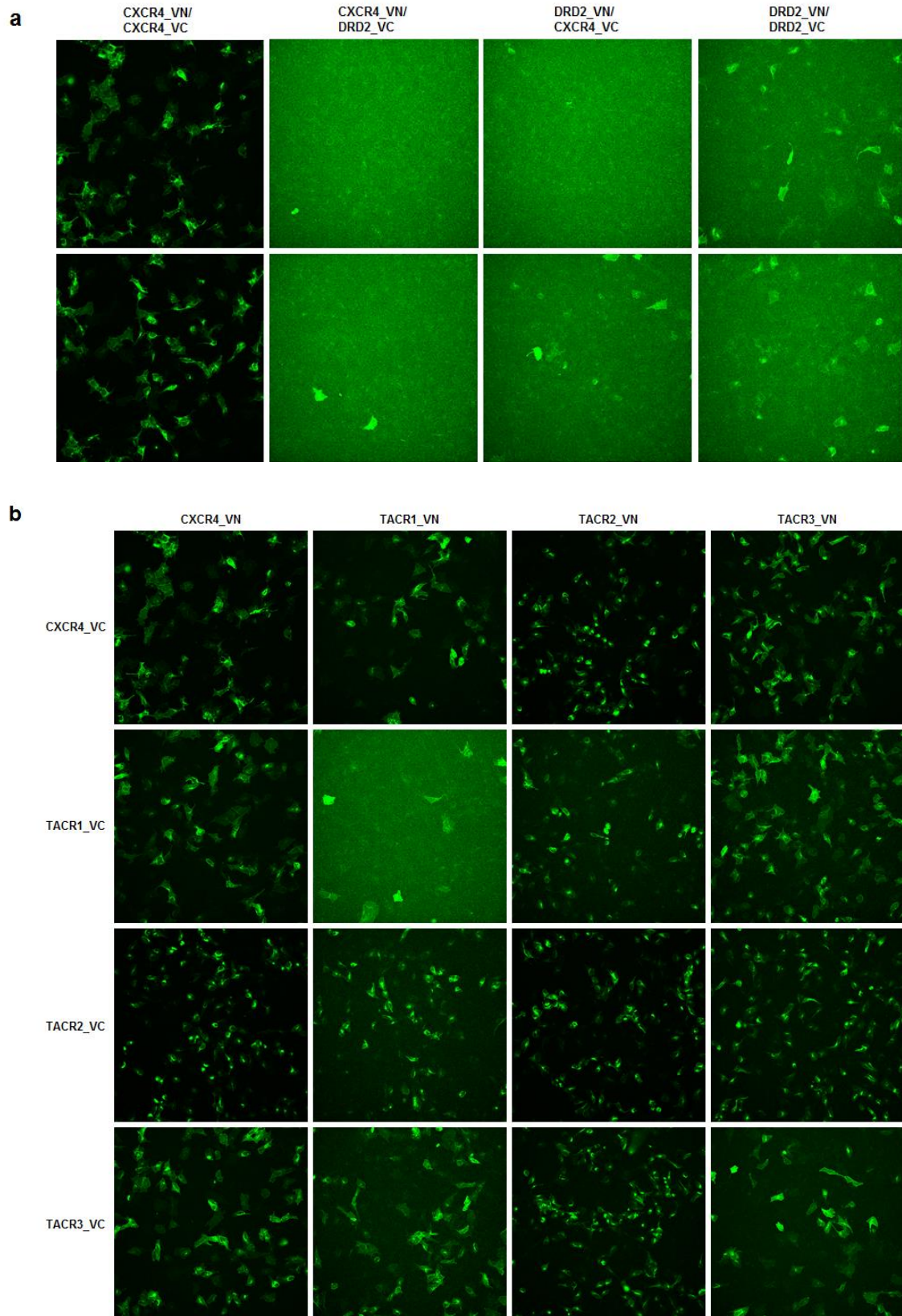


그림 2. BiFC를 이용하여 관찰한 CXCR4와 GPCR-X family의 중합체 형성

a, Positive/Negative Control. CXCR4의 동형중합체가 형성된 것에 반하여 DRD2와 CXCR4 간에는 중합체가 형성되지 않았다. **b**, CXCR4와 GPCR-X family 간의 BiFC 결과. GPCR-X1은 동형이합체를 형성하지 않았으며 GPCR-X2와의 상호작용은 GPCR-X1, GPCR-X3과 비교하였을 때 다른 양상의 localization을 보였다.

2.2 BRET assay로 살펴 본 homomer 및 heteromer 형성

BRET은 RLuc8과 EYFP 혹은 이와 비슷한 파장을 보이는 mCitrine 사이의 에너지 전달로 측정하게 되는데 이 실험을 위해서 CXCR4와 GPCR-X family에 LR recombination으로 연결시킨 후 재조합 플라스미드를 발현시켰으며 topology의 영향을 확인하기 위하여 reciprocal한 경우도 고려하여 실험을 진행하였다. 양성 대조군으로는 RLuc8과 EYFP를 연속되도록 연결하여 놓은 플라스미드와 homomer를 형성하는 CXCR4를 이용하였는데 CXCR4 homomer의 BRET 세기가 더 큰 결과를 나타내었다. BRET net ratio를 구하기 위해서는 RLuc8만 존재하는 조건에서의 BRET 세기를 빼주어야 하므로 모든 실험 구성에 포함시켰으며 음성 대조군으로는 GPCR에 RLuc8을 연결하고 mCitrine은 연결된 GPCR없이 플라스미드 상태로 주입하여 발현만 되도록 하였는데, 이에 따른 BRET 세기는 매우 적은 값을 나타내었다.

GPCR-X1과 GPCR-X3는 비슷한 양상의 BRET 세기를 나타내었는데, mCitrine이 연결된 형태가 RLuc8이 연결된 형태보다 세 배 정도 더 높은 결과를 나타낸 것을 확인하였다. 반면 GPCR-X2는 topology에 상관없이 비슷한 세기를 보였는데 그 세기가 GPCR-X1과 GPCR-X3에 비교하였을 때 약 절반 정도에 해당하는 값을 나타내었다 (그림3).

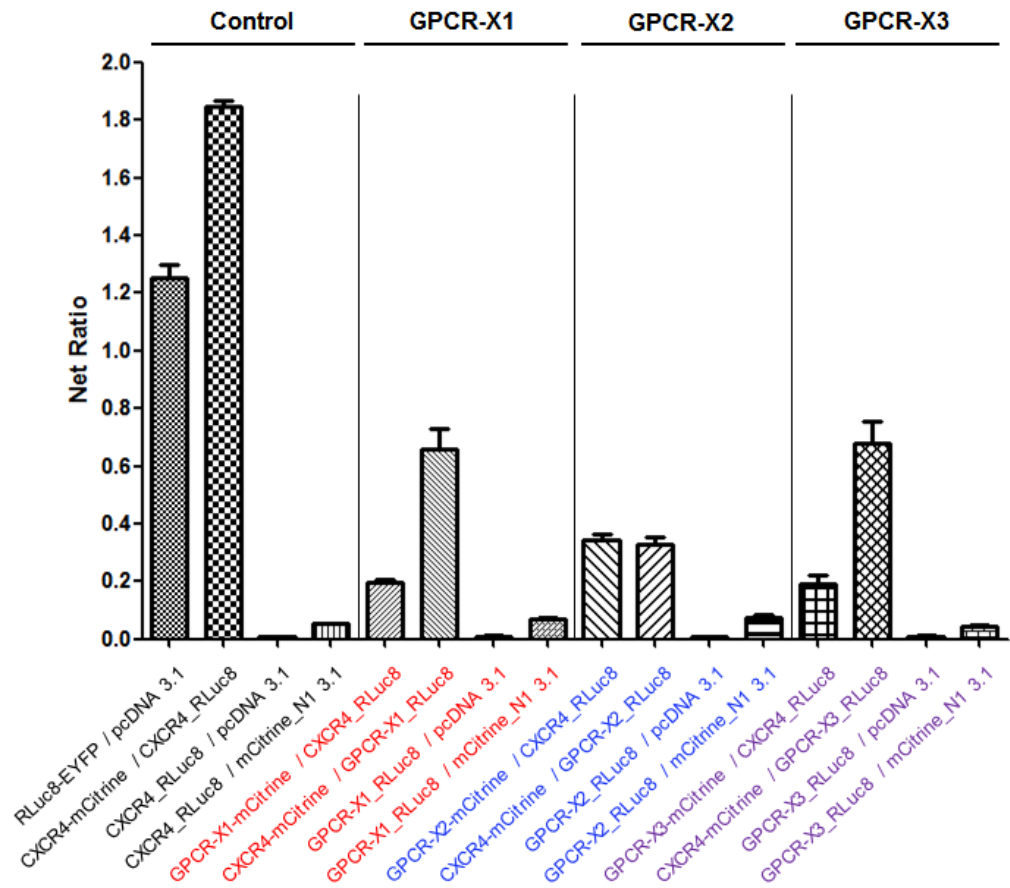


그림 3. CXCR4와 GPCR-X family의 BRET net ratio

RLuc8과 EYFP가 연결되어 있는 플라스미드와 CXCR4 동형 이합체를 각각 양성 대조군으로, pcDNA 3.1과 mCitrine 단독 플라스미드를 각각 음성 대조군으로 사용하였다.

2.3 Co-internalization assay로 살펴 본 homomer 및 heteromer 형성

본격적인 실험에 앞서 (그림 4a)에서 볼수 있듯이 CXCR4가 본인에게만 선택적으로 작용하는 리간드인 CXCL12에만 반응하고, GPCR-X family의 리간드들과 vehicle에는 반응하지 않는 것을 확인하였다. mEGFP를 연결한 CXCR4는 세포 표면에서 발현하고 있다가 CXCL12 처리 후 30분이 지난 후에는 granule를 형성하며 internalize 되었지만 다른 처리 조건에서는 30분이 지나도 그대로 세포 표면에서의 발현을 유지하고 있었다.

HEK293A에 CXCR4와 GPCR-X를 Lipofectamine 2000®을 이용하여 co-expression 시켜준 조건에서 서로에 선택적으로 작용하는 리간드를 하나씩 처리하였다. Co-expression 조건에서 CXCL12를 처리하였을 때 CXCR4는 GPCR-X의 종류에 관계없이 internalize되는 것을 관찰할 수 있었으나 모든 GPCR-X에서는 가시적인 발현 양상의 변화를 발견하지 못하였다 (그림 4b). 이에 반해 GPCR-X1의 리간드를 처리하였을 때에는 GPCR-X1은 물론이고 대조군 실험에서는 이전에 반응하지 않았던 CXCR4도 internalize 되는 양상을 보였으며 그 위치가 (화살표)에서 볼 수 있듯 일치하는 모습을 보였다 (그림 4c). CXCR4와 GPCR-X2는 같이 발현시켜준 조건에서도 단독 발현시의 위치를 그대로 유지하고 있었는데, CXCR4는 세포 표면에 위치하고 GPCR-X2는 세포막 내부에서 granule을 형성하고 있었다. GPCR-X2의 존재 여부에 관계없이 CXCR4는 CXCL12에 반응하였지만 GPCR-X2의 리간드에는 반응하지 않는 모습을 보였으며 GPCR-X2 또한 리간드 처리 이전부터 세포막 내부에 존재하였기 때문에 리간드에 대한 반응의 정도를 뚜렷하게 구분할 수 없었다 (그림 5a, 5b). GPCR-X3는 GPCR-X1과 같은 양상을 나타내었다 (그림 6a, 6b).

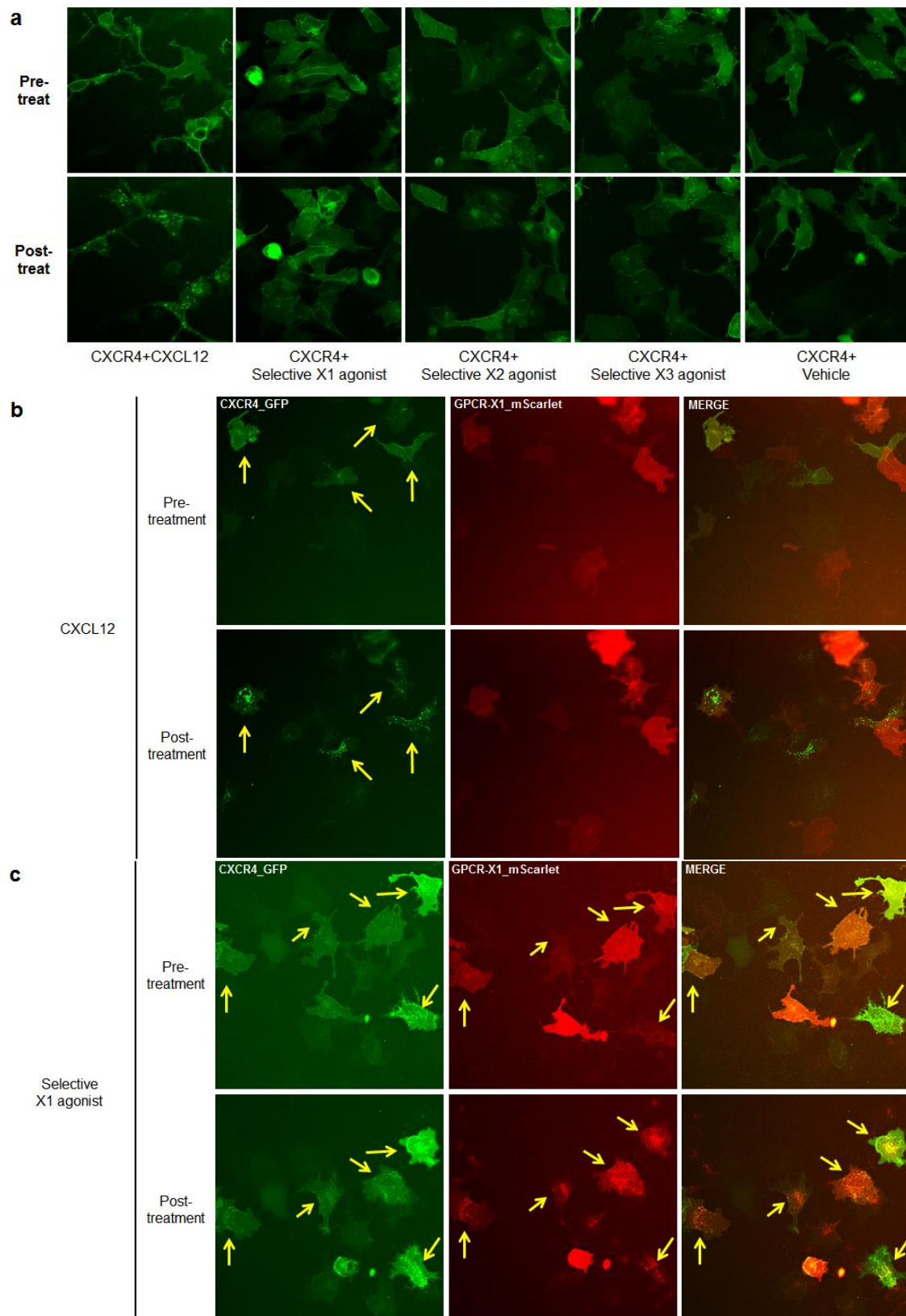


그림 4. 선택적 리간드를 이용한 CXCR4와 GPCR-X1의 co-internalization assay.

a, MDA-MB-231에서 발현시킨 CXCR4는 자신의 리간드인 CXCL12에만 반응하여 internalization 되었다. **b**, CXCR4 (GFP)와 GPCR-X1 (mScarlet)를 MDA-MB-231에서 과발현 시켜준 상태에서 CXCR4의 리간드인 CXCL12를 사용하여 internalization 패턴 (화살표)을 관찰하였다. **c**, 같은 조건에서 GPCR-X1의 리간드인 X1 agonist를 사용하여 internalization 패턴 (화살표)을 관찰하였다.

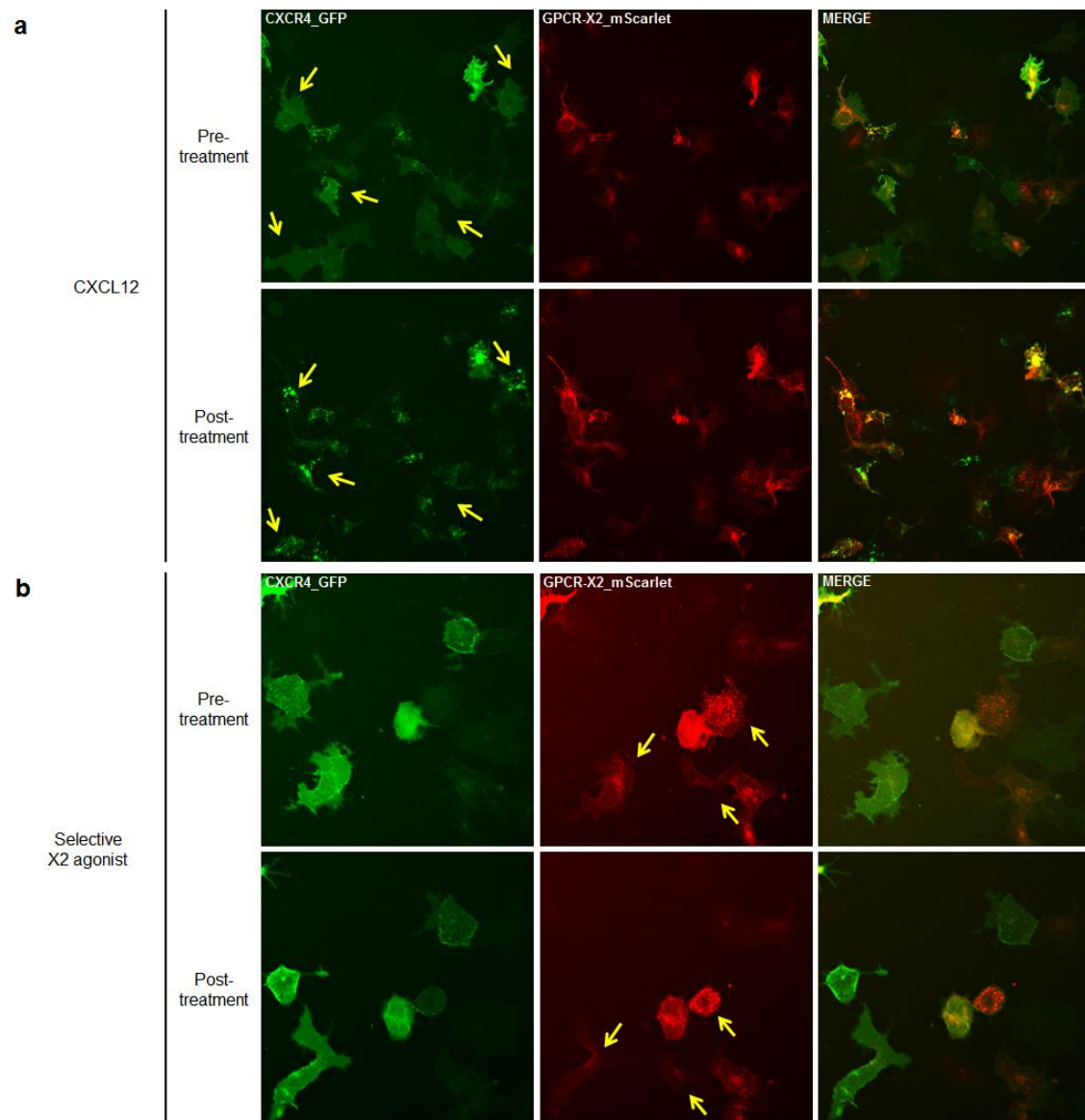


그림 5. 선택적 리간드를 이용한 CXCR4와 GPCR-X2의 co-internalization assay.

a, MDA-MB-231에서 발현시킨 CXCR4는 자신의 리간드인 CXCL12에만 반응하여 internalization 되었다. **b**, CXCR4 (GFP)와 GPCR-X2 (mScarlet)를 MDA-MB-231에서 과발현 시켜준 상태에서 CXCR4의 리간드인 CXCL12를 사용하여 internalization 패턴 (화살표)을 관찰하였다. **c**, 같은 조건에서 GPCR-X2의 리간드인 X2 agonist를 사용하여 internalization 패턴 (화살표)을 관찰하였다.

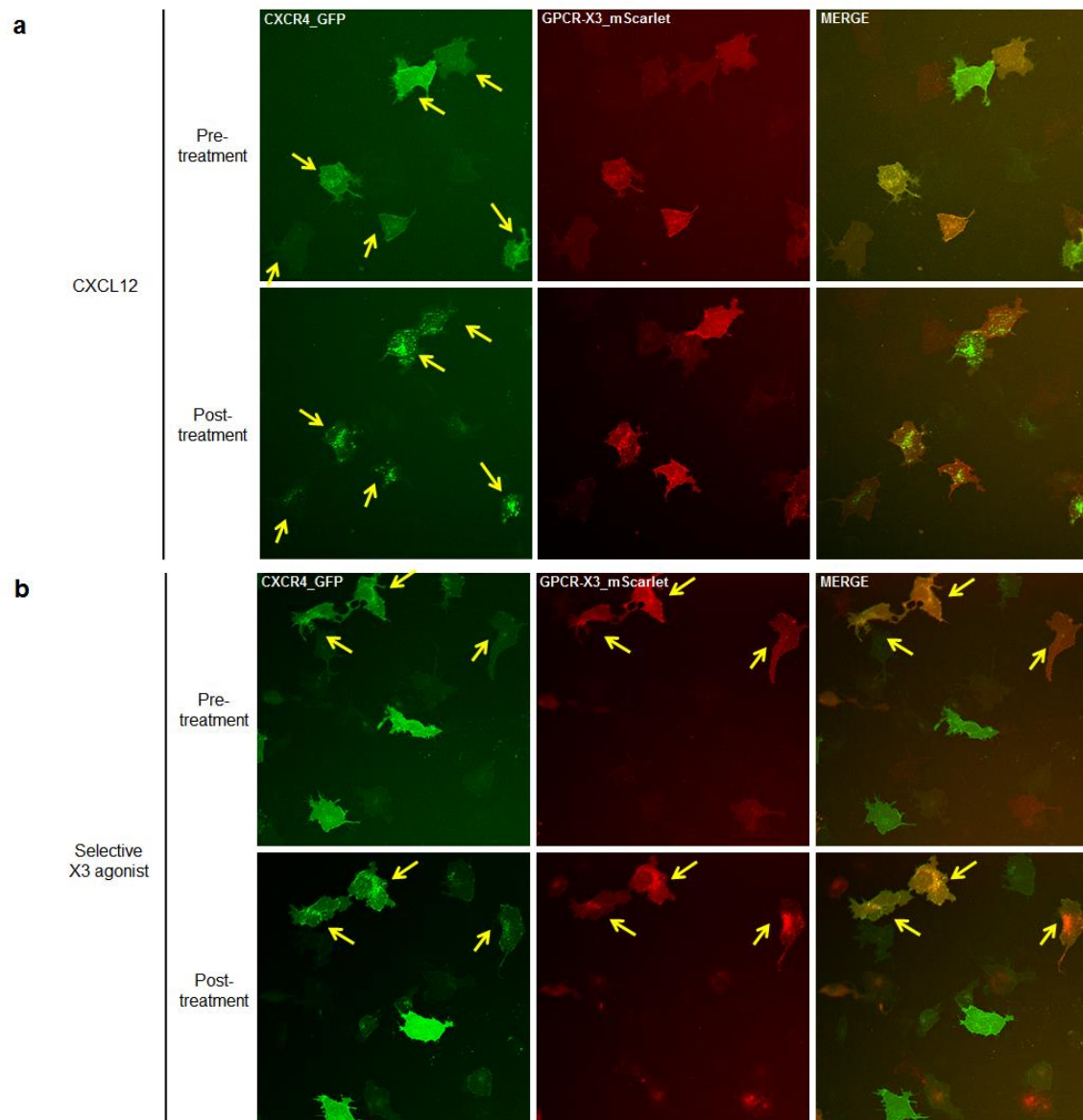


그림 6. 선택적 리간드를 이용한 CXCR4와 GPCR-X3의 co-internalization

a, MDA-MB-231에서 발현시킨 CXCR4는 자신의 리간드인 CXCL12에만 반응하여 internalization 되었다. **b**, CXCR4 (GFP)와 GPCR-X3 (mScarlet)를 MDA-MB-231에서 과발현 시켜준 상태에서 CXCR4의 리간드인 CXCL12를 사용하여 internalization 패턴 (화살표)을 관찰하였다. **c**, 같은 조건에서 GPCR-X3의 리간드인 X3 agonist를 사용하여 internalization 패턴 (화살표)을 관찰하였다.

3. CXCR4와 GPCR family의 상호작용에 따른 세포 내 칼슘

이온 농도의 변화

Cal-520[®]은 permeabilization의 과정 없이도 세포막 내부의 칼슘 이온과 결합하여 형광을 뿜 수 있다. 이러한 Cal-520[®]을 이용하면 형광 세기의 측정만으로도 세포 내 칼슘 이온 농도를 관찰할 수 있게 된다. CXCR4와 각 GPCR-X family의 co-expression 조건에서 두 GPCR의 상호작용에 따라 칼슘 농도의 양상이 어떻게 달라지는지를 관찰하였다. 세포는 MDA-MB-231을 사용하였으며 유전자 전달 벡터로는 재조합 adenovirus를 사용하였다.

3.1 Synergistic effect

두 개의 GPCR을 co-expression 시켜주는 조건은 물론이고 각각의 GPCR을 하나씩 발현시키는 조건도 함께 테스트하였는데, total adenovirus의 양이 40 MOI가 되도록 어떤 GPCR도 발현시키지 않는 HA-VC adenovirus를 함께 transduction 사용하였다. 또한 세 가지 발현 조건에서 CXCR4 특이적 리간드, GPCR-X family 특이적 리간드, 그리고 앞의 두 리간드를 함께 처리하는 co-treat의 세 가지 조건을 테스트하여 칼슘 이온 농도의 차이가 나타나는지를 관찰하였다. CXCR4만을 발현시킨 MDA-MB-231 세포에서는 CXCL12에 대해서는 반응을 나타내었으나 GPCR-X1의 리간드에는 반응을 나타내지 않았으며 두 리간드를 함께 처리하는 조건에서도 차이를 보이지 않고 CXCL12 단독 처리와 같은 칼슘 이온 농도의 변화를 보였다 (그림 7a).

GPCR-X1만을 발현시킨 MDA-MB-231 세포는 CXCL12에 대해서는 반응을 보이지 않았으며 자신에게 선택적으로 작용하는 리간드에 대해서는 처리 시에 칼슘 이온 농도의 증가를 보였다. 또한 CXCL12와 각 GPCR-X1 리간드를 동시 처리한 실험군에서는 GPCR-X1 특이적 리간드만을 처리한 파란색 그래프의 데이터보다 조금 더 높은 칼슘 이온 농도의 증가를 확인할 수 있었다 (그림 7b)

공통적으로 사용된 CXCR4와 세 개의 GPCR-X family 중 한 가지를 선택하여 두 가지 GPCR을 모두 과발현시킨 MDA-MB-231 세포는 각 수용체에 특이적으로 작용하는 리간드의 처리 시에는 앞의 결과에서 확인하였던 양상과 크게 다르지 않았다. GPCR의 수에 관계없이 같은 정도의 칼슘 이온 농도의 증가만을 보인 것이다. 그런데 두 가지 GPCR을 모두 활성화시키는 조건인 두 리간드의 co-treat 조건에서는 그래프의 보라색 데이터에서 확인할 수 있듯 칼슘 농도의 증가 속도와 총 증가량 모두에서 급격한 증가를 나타내었다 (그림 7c). 각 3세트의 데이터를 포함하는 (그림 7a, 그림 7b, 그림 7c)의 데이터를 Graphpad Prism 5를 이용하여 그래프화하여 나타내고 unpaired, two-tailed t-test를 실행한 결과 CXCR4를 단독으로 발현하건 GPCR-X1과 함께 발현하건 CXCL12에 의한 CXCR4의 칼슘 농도 증가의 양상이 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다 (그림 7d). 또한 CXCR4와 GPCR-X1을 과발현시킨 조건만을 따로 그래프화한 것으로 하얀색 막대는 CXCR4의 시그널(빨강)과 각 GPCR-X1의 시그널(파랑)을 수학적으로 합한 값이며 이를 선택적 리간드들의 co-treat조건에서의 시그널(보라)와 비교하여 통계처리하였다. 그래프와 통계 처리는 Graphpad Prism 5를 이용하였으며 unpaired, two-tailed t-test (n=3)를 사용하였다. P-value는 <0.0001이었다 (그림 7e). GPCR-X2, GPCR-X3도 같은 방식으로 실험을 진행하였으며 결과도 GPCR-X1 실험과 매우 비슷하였으며 GPCR-

X family만을 발현시킨 조건에서 두 리간드의 co-treat에 의한 칼슘 농도의 증가가 GPCR-X1, GPCR-X2, GPCR-X3의 순서대로 조금 높았다는 차이를 보였다 (그림 8, 그림 9).

반면에 대조군으로 사용한 또 다른 GPCR인 GPCR-Y는 CXCR4와 함께 발현시키는 것만으로도 CXCL12에 의한 CXCR4의 반응을 기저 수준까지 끌어내렸다 (그림 10). 이것으로 보아 CXCR4와 GPCR-X family 사이에서 이형중합체를 기반으로 하는 synergistic effect는 GPCR-X family에 특이적인 현상이며, 단순히 다양한 GPCR들을 동시에 발현시키는 것만으로는 synergistic effect가 생기지 않는다는 것을 확인할 수 있다.

3.2 Selective antagonist를 이용한 synergistic effect의 저해

앞의 그림 7, 그림8, 그림9에서 보였던 CXCR4-GPCR-X family 사이의 상호작용이 실험 전반에 걸쳐 계속 사용하였던 리간드들과 같은 작용 부위를 갖는 antagonist들을 처리하였을 때, 칼슘 이온 농도의 변화가 어떻게 달라지는지를 보기 위하여 각 GPCR에 특이적으로 작용하는 antagonist들을 리간드 처리 및 칼슘 이온 농도의 측정 전 30분동안 미리 처리하였다.

Antagonist를 처리하지 않은 조건에서는 앞의 결과가 재현되었으며 (그림 11a) CXCR4 selective antagonist인 AMD3100을 처리하였을 때는 co-treat 조건에서의 synergistic effect (보라색 막대)가 소폭 감소하였다 (그림 11b). 반면 GPCR-X1에 특이적으로 작용하는 X1 antagonist를 처리하였을 때에는 co-treat의 상승 작용이 매우 큰 폭으로 줄어들었다 (그림 11c). 또한 발현시킨 두 가지 GPCR에 해당하는 antagonist를 모두 처리한 경우, 어떤 리간드도 처리

하지 않아 칼슘 증가를 나타내지 않은 검은색 그래프의 수준까지 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 11d). GPCR-X2, GPCR-X3의 실험은 각 GPCR-X family에 선택적으로 작용하는 agonist와 antagonist를 사용하여 GPCR-X1과 동일하게 진행되었으며 결과 또한 동일하였다. (그림 12, 그림 13)

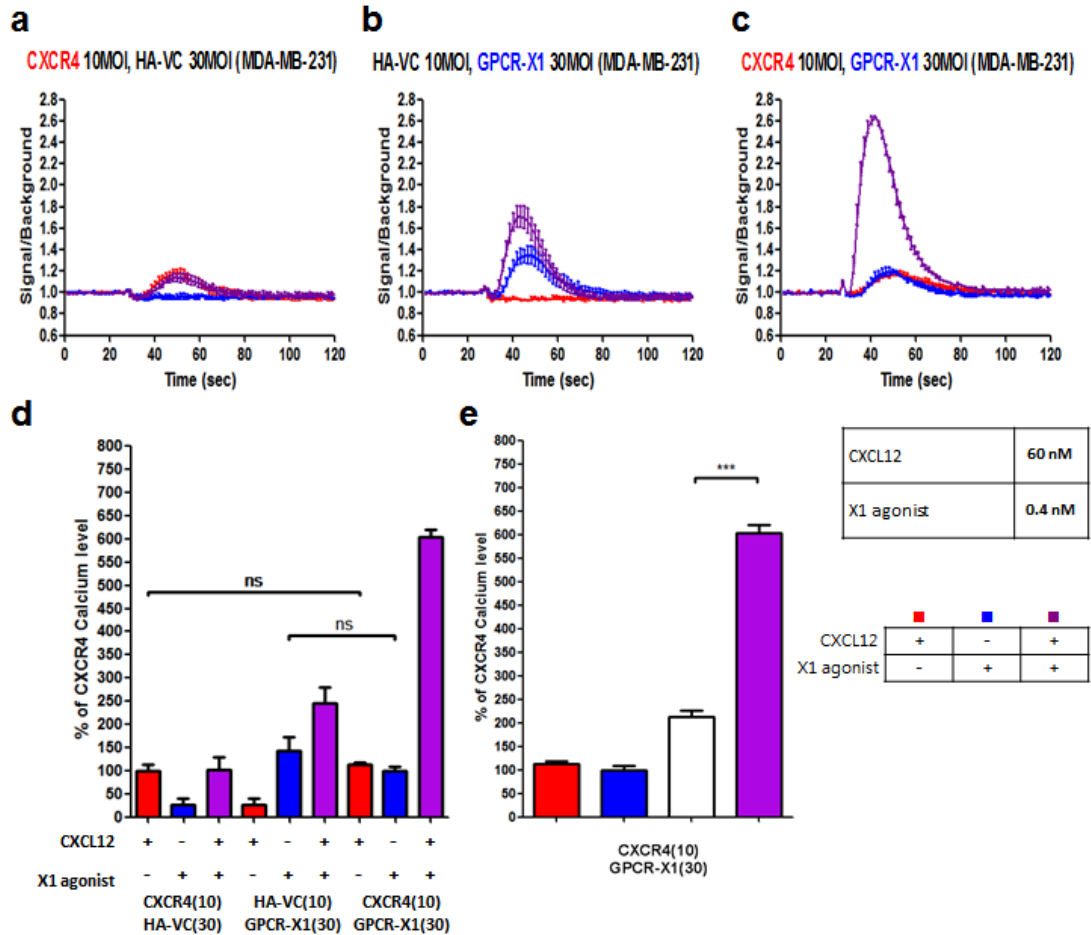


그림 7. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-X1 사이의 synergistic 상호작용

HA-VC 아데노바이러스와 함께 총 40 MOI 에 맞추어 transduction 시켰다. Cal-520 을 이용하여 세포 내 칼슘 농도 변화를 Flex Station 3 를 이용하여 측정한 결과 CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 빨간색 그래프만큼의 반응을 보였다. GPCR-X1 의 리간드인 X1 agonist 처리시에는 파란색 그래프와 같이 반응을 나타내지 않았다. 두 리간드를 동시에 처리하였을 때에도 빨간색 그래프만큼의 반응을 나타내었다. **b**, GPCR-X1 을 발현하도록 재조합한 아데노바이러스를 GPCR 을 발현하지 않는 HA-VC 아데노바이러스와 함께 총 40 MOI 에 맞추어 transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 빨간색 그래프처럼 칼슘 농도가

증가하지 않았다. GPCR-X1 의 리간드인 X1 agonist 처리시에는 파란색 그래프만큼의 증가를 나타내었다. 두 리간드를 동시에 처리하였을 때의 보라색 그래프는 파란색 그래프보다 조금 높은 반응을 나타내었다. **c**, CXCR4 와 GPCR-X1 을 동시에 각각 발현하도록 두 가지의 재조합 아데노바이러스를 총 40 MOI 에 맞추어 co-transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 빨간색 그래프만큼의 반응을 보였다. GPCR-X1 의 리간드인 X1 agonist 처리시에는 파란색 그래프의 반응을 나타내었다. 두 리간드를 동시에 처리한 보라색 그래프에서는 속도와 총량에서 칼슘 이온 농도의 급격한 증가를 보였다.

d, **(a)**, **(b)**, **(c)**에서의 변화된 칼슘 이온의 총량을 area under the curve (AUC)를 구하여 계산하였다. 그래프와 통계 처리는 GraphPad Prism 5 를 이용하였으며 unpaired, two-tailed t-test (n=3)를 사용하였다. **e**, CXCR4 와 GPCR-X1 을 과발현시킨 조건만을 따로 그래프화한 것으로 하얀색 막대는 CXCR4 의 시그널(빨강)과 각 GPCR-X1 의 시그널(파랑)을 수학적으로 합한 값이며 이를 선택적 리간드들의 co-treat 조건에서의 시그널(보라)와 비교하여 통계처리하였다. 그래프와 통계 처리는 GraphPad Prism 5 를 이용하였으며 unpaired, two-tailed t-test (n=3)를 사용하였다. P-value 는 <0.0001 이었다.

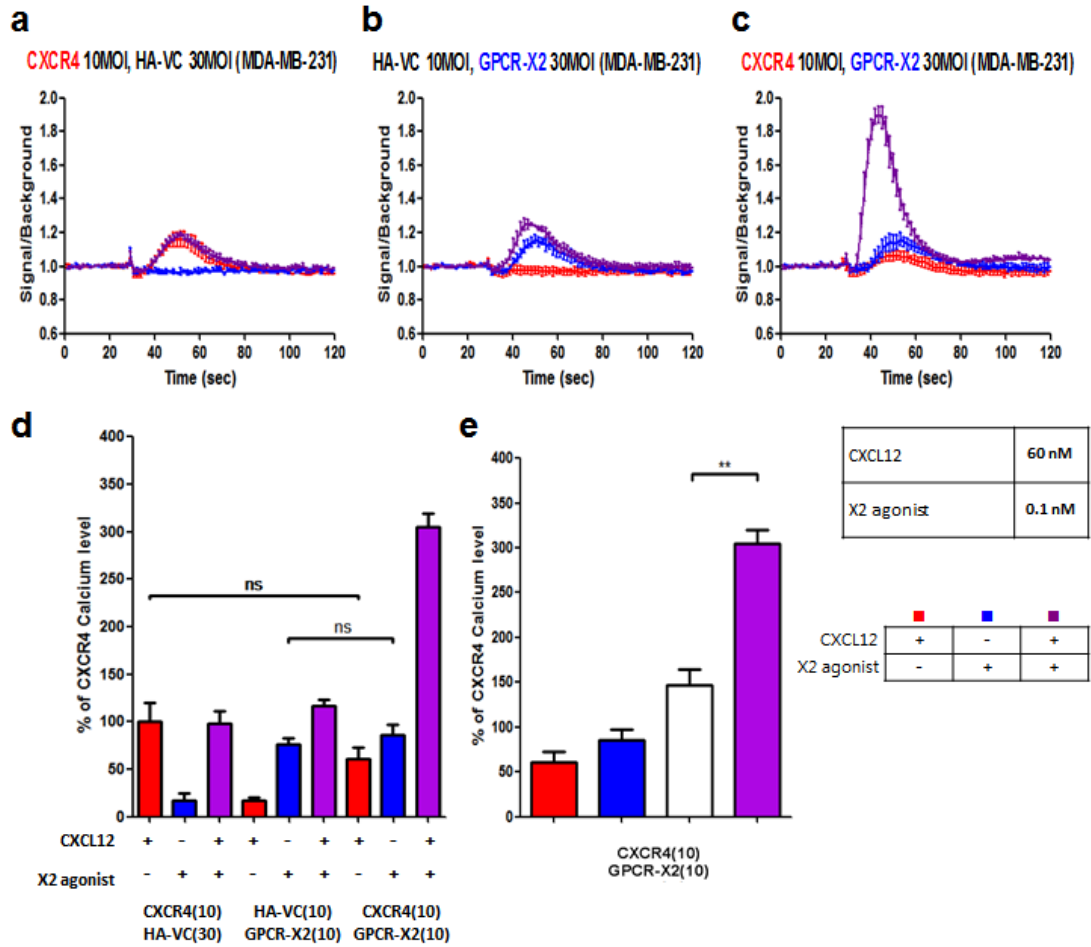


그림 8. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-X2 사이의 synergistic 상호작용

a-d, (그림 7)과 동일한 실험이며 GPCR-X2 와 그 리간드인 X2 agonist 를 사용하였다. e, 그래프와 통계 처리는 GraphPad Prism 5 를 이용하였으며 unpaired, two-tailed t-test (n=3)를 사용하였다. P-value 는 0.0025 이었다.

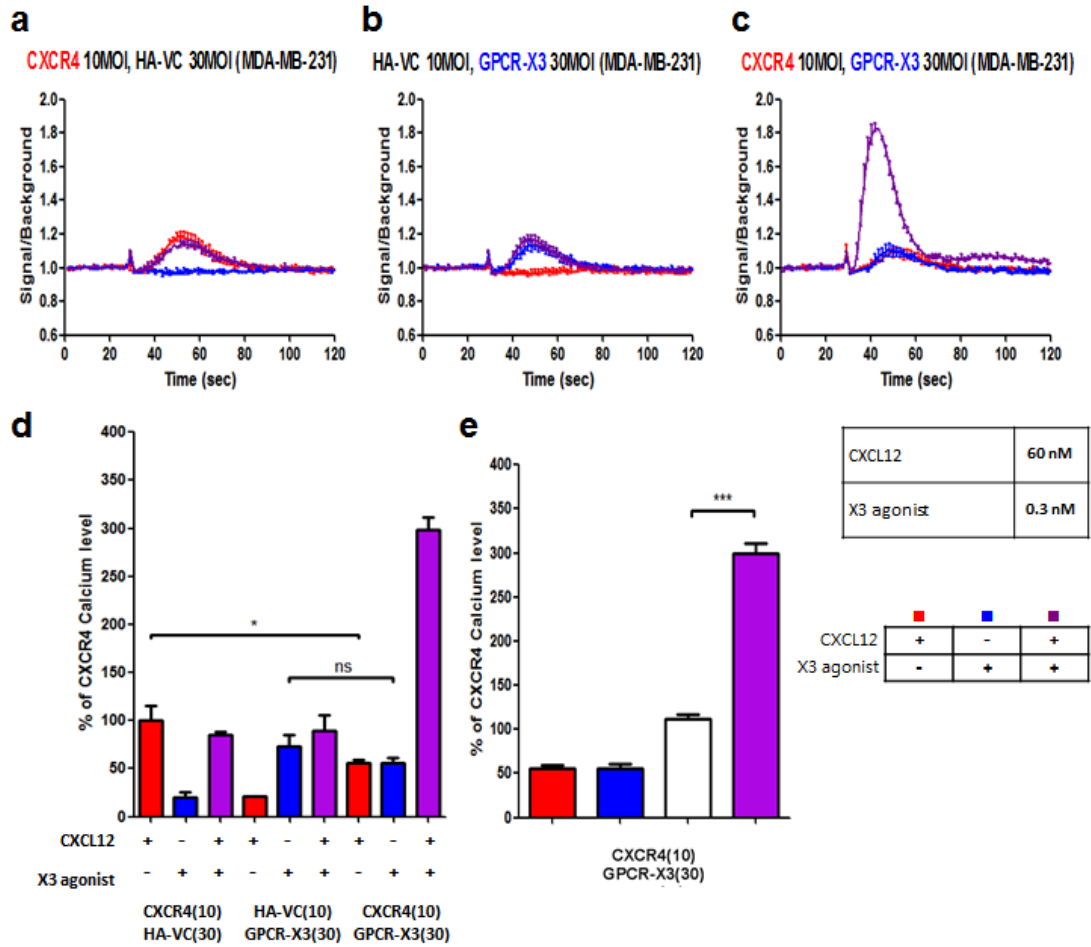


그림 9. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-X3 사이의 synergistic 상호작용

a-d, (그림 7)과 동일한 실험이며 GPCR-X2 와 그 리간드인 X3 agonist 를 사용하였다. e, 그래프와 통계 처리는 GraphPad Prism 5 를 이용하였으며 unpaired, two-tailed t-test (n=3)를 사용하였다. P-value 는 0.0001 이었다.

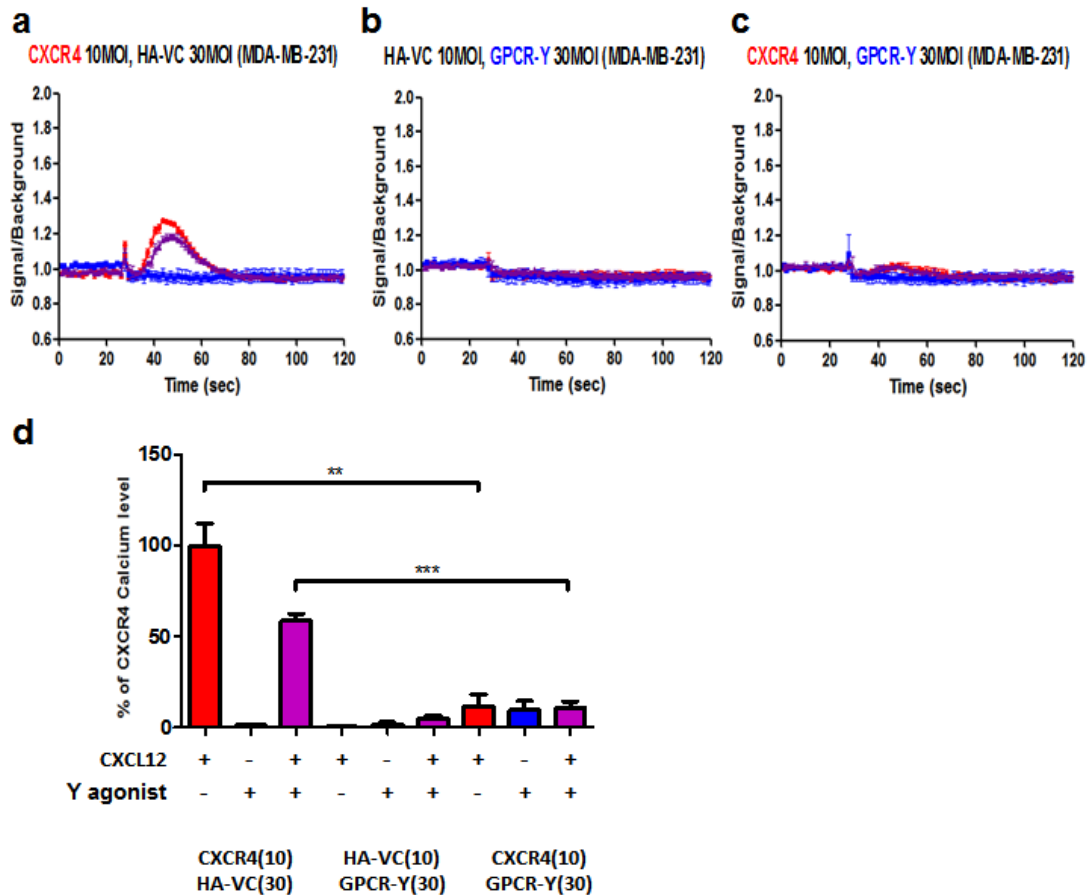


그림 10. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화로 관찰한 CXCR4와 GPCR-Y 사이의 상호작용

a-d, CXCR4 를 발현하도록 재조합한 아데노바이러스를 GPCR 을 발현하지 않는 HA-VC 아데노바이러스와 함께 총 40 MOI 에 맞추어 transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 빨간색 그래프만큼의 반응을 보였다. GPCR-Y 의 리간드인 Y agonist 처리시에는 파란색 그래프와 같이 반응을 나타내지 않았다. 두 리간드를 동시에 처리하였을 때에도 빨간색 그래프보다 칼슘 농도의 증가가 약간 감소한 칼슘하였다. **b**, GPCR-Y 를 발현하도록 재조합한 아데노바이러스를 GPCR 을 발현하지 않는 HA-VC 아데노바이러스와 함께 총 40 MOI 에 맞추어 transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는

빨간색 그래프처럼 칼슘 농도가 증가하지 않았다. GPCR-X1 의 리간드인 Y agonist 처리시에도 파란색 그래프처럼 반응을 나타내지 않았다. 두 리간드를 동시에 처리하였을 때의 보라색 그래프는 칼슘 농도의 증가는 없었다. **c**, CXCR4 와 GPCR-Y 를 동시에 각각 발현하도록 두 가지의 재조합 아데노바이러스를 총 40 MOI 에 맞추어 co-transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 칼슘 농도가 **(a)**에서보다 급격히 감소하였다. GPCR-Y 의 리간드인 Y agonist 처리시에는 파란색 그래프처럼 반응이 없었다. 두 리간드를 동시에 처리한 보라색 그래프에서도 빨간색 그래프처럼 칼슘 농도의 증가가 줄어들었다. **d**, **(a)**, **(b)**, **(c)** 에서의 변화된 칼슘 이온의 총량을 area under the curve (AUC)를 구하여 계산하였다. 그래프와 통계 처리는 GraphPad Prism 5 를 이용하였으며 unpaired, two-tailed t-test (n=3)를 사용하였다. 빨간색 그래프는 p value = 0.0033, 보라색 그래프는 p value = 0.0008 로 각각 CXCL12 에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가량이 크게 감소하였다.

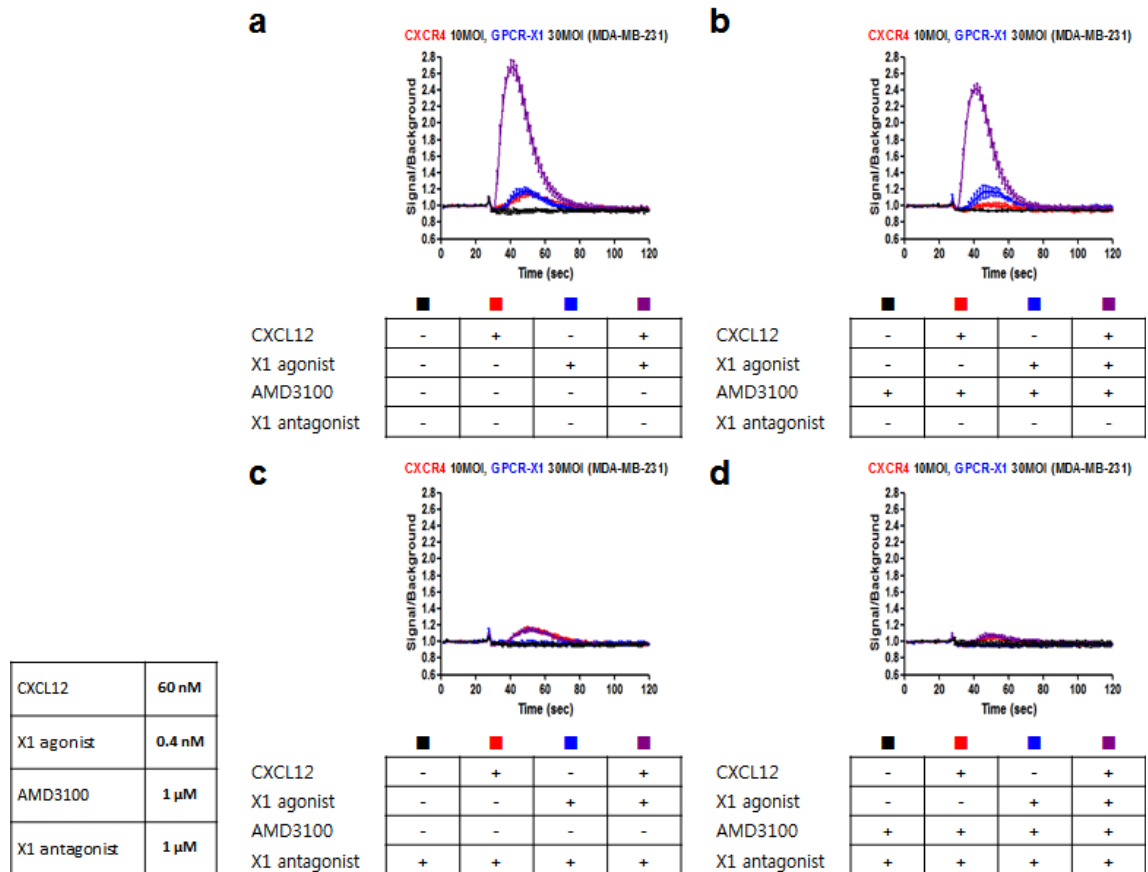


그림 11. CXCR4, GPCR-X1 선택적 antagonist 처리 후 관찰한 synergistic effect의 변화

a, CXCR4 와 GPCR-X1 을 동시에 각각 발현하도록 두 가지의 재조합 아데노바이러스를 총 40 MOI 에 맞추어 co-transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 빨간색 그래프만큼의 반응을 보였다. GPCR-X1 의 리간드인 X1 agonist 처리시에는 파란색 그래프의 반응을 나타내었다. 두 리간드를 동시에 처리한 보라색 그래프에서는 속도와 총량에서 칼슘 이온 농도의 급격한 증가를 보였다. 어떤 리간드도 처리하지 않은 조건은 검은색 그래프처럼 칼슘 농도의 변화가 나타나지 않았다. **b**, (a) 실험 전 30 분동안 CXCR4 선택적 antagonist 인 AMD3100 을 처리하였다. 그 결과 파란색 그래프는 감소를 보이지 않았으나 CXCR4 의 반응을 나타내는

빨간색 그래프는 크게 감소하였다. 보라색 그래프도 약간 감소한 모습을 보였다. **c**, **(a)**의 실험 전 30 분동안 GPCR-X1 선택적 antagonist 인 X1 antagonist 를 처리하였다. 그 결과 빨간색 그래프는 감소를 보이지 않았으나 GPCR-X1 의 반응을 나타내는 파란색 그래프는 검은색 그래프 수준까지 감소하였다. Synergistic effect 를 나타내는 보라색 그래프도 매우 크게 감소하여 빨간색 그래프 수준까지 줄어들었다. **d**, **(a)**의 실험 전 30 분동안 CXCR4 의 선택적 antagonist 인 AMD3100 과 GPCR-X1 선택적 antagonist 인 X1 antagonist 를 동시에 처리하였다. 그 결과 모든 그래프가 검은색 그래프 수준까지 줄어드는 것을 관찰하였다.

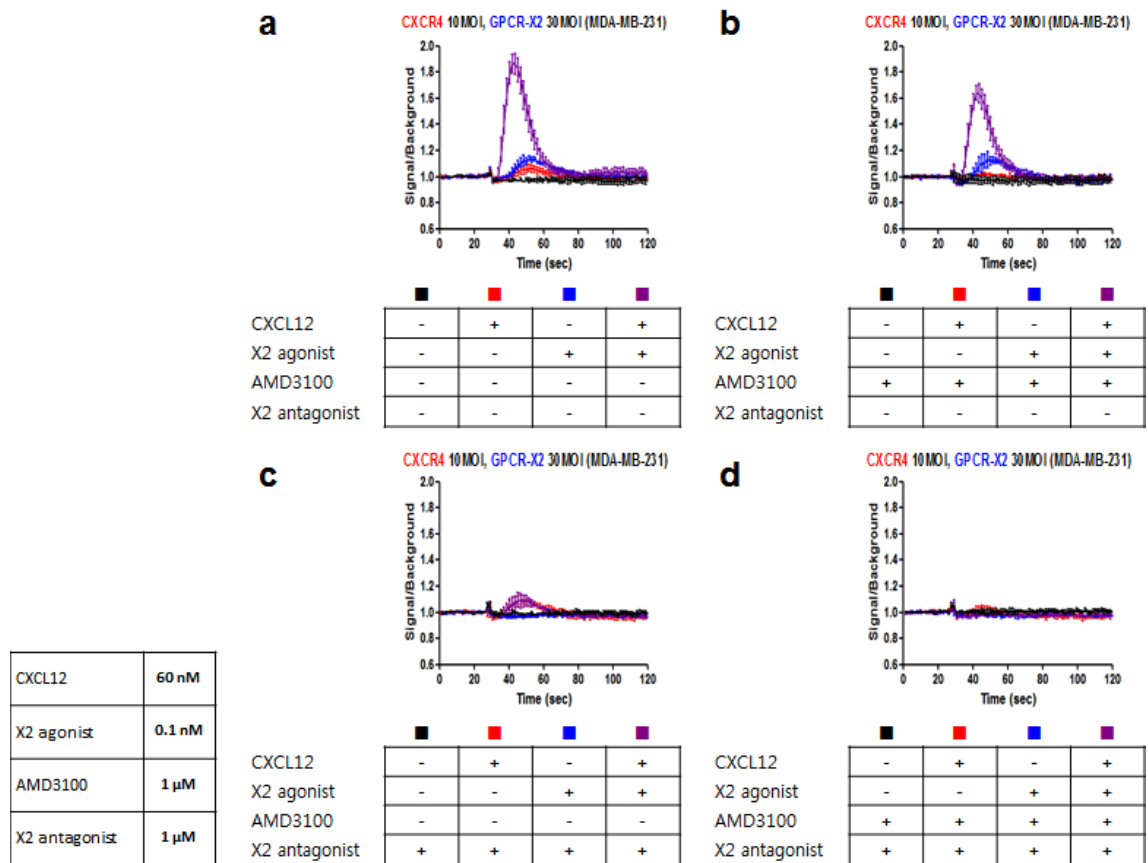


그림 12. CXCR4, GPCR-X2 선택적 antagonist 처리 후 관찰한 synergistic effect의 변화

a, CXCR4 와 GPCR-X2 을 동시에 각각 발현하도록 두 가지의 재조합 아데노바이러스를 총 40 MOI 에 맞추어 co-transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 빨간색 그래프만큼의 반응을 보였다. GPCR-X2 의 리간드인 X2 agonist 처리시에는 파란색 그래프의 반응을 나타내었다. 두 리간드를 동시에 처리한 보라색 그래프에서는 속도와 총량에서 칼슘 이온 농도의 급격한 증가를 보였다. 어떤 리간드도 처리하지 않은 조건은 검은색 그래프처럼 칼슘 농도의 변화가 나타나지 않았다. **b**, (a)의 실험 전 30 분동안 CXCR4 선택적 antagonist 인 AMD3100 을 처리하였다. 그 결과 파란색 그래프는 감소를 보이지 않았으나 CXCR4 의 반응을 나타내는 빨간색 그래프는 크게 감소하였다. 보라색 그래프도 약간

감소한 모습을 보였다. **c**, **(a)**의 실험 전 30 분동안 GPCR-X2 선택적 antagonist 인 X2 antagonist 를 처리하였다. 그 결과 빨간색 그래프는 감소를 보이지 않았으나 GPCR-X2 의 반응을 나타내는 파란색 그래프는 검은색 그래프 수준까지 감소하였다. Synergistic effect 를 나타내는 보라색 그래프도 매우 크게 감소하여 빨간색 그래프 수준까지 줄어들었다. **d**, **(a)**의 실험 전 30 분동안 CXCR4 의 선택적 antagonist 인 AMD3100 과 GPCR-X2 선택적 antagonist 인 X2 antagonist 를 동시에 처리하였다. 그 결과 모든 그래프가 검은색 그래프 수준까지 줄어드는 것을 관찰하였다.

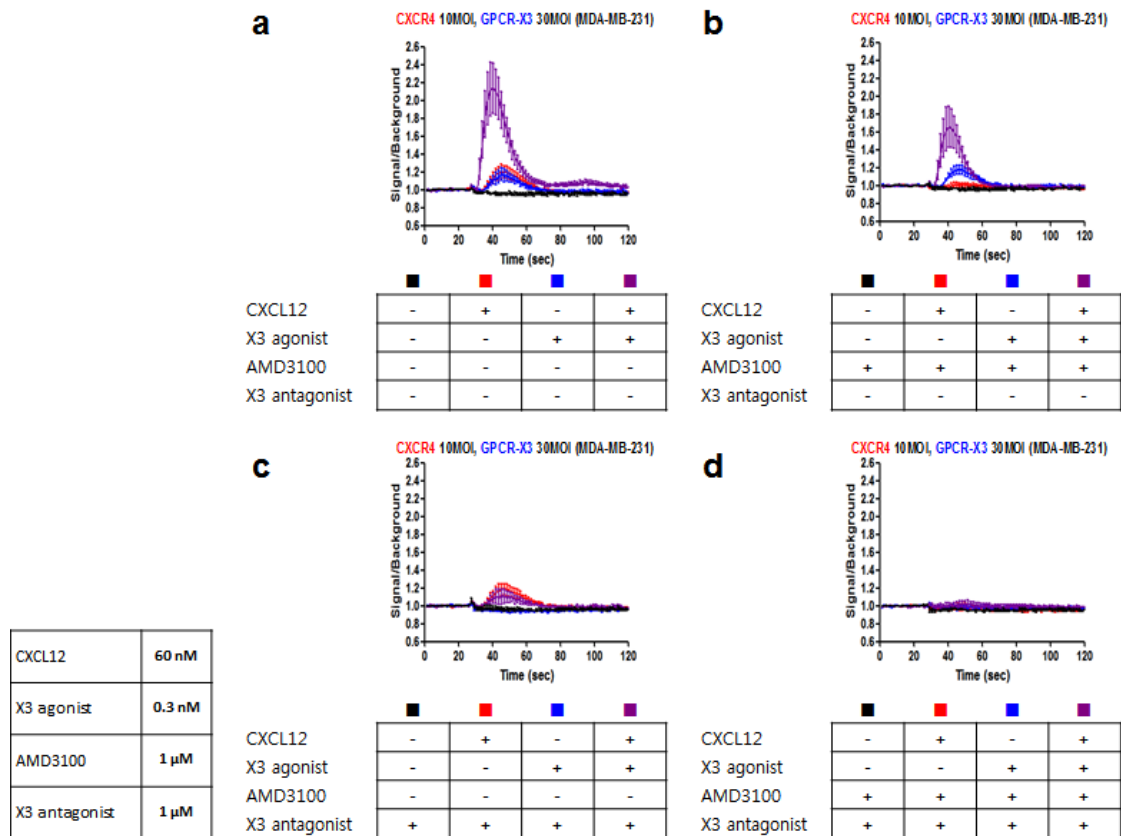


그림 13. CXCR4, GPCR-X3 선택적 antagonist 처리 후 관찰한 synergistic effect의 변화

a, CXCR4 와 GPCR-X3 을 동시에 각각 발현하도록 두 가지의 재조합 아데노바이러스를 총 40 MOI 에 맞추어 co-transduction 시켰다. CXCR4 의 리간드인 CXCL12 를 처리하였을 때에는 빨간색 그래프만큼의 반응을 보였다. GPCR-X3 의 리간드인 X3 agonist 처리시에는 파란색 그래프의 반응을 나타내었다. 두 리간드를 동시에 처리한 보라색 그래프에서는 속도와 총량에서 칼슘 이온 농도의 급격한 증가를 보였다. 어떤 리간드도 처리하지 않은 조건은 검은색 그래프처럼 칼슘 농도의 변화가 나타나지 않았다. b, (a)의 실험 전 30 분동안 CXCR4 선택적 antagonist 인 AMD3100 을 처리하였다. 그 결과 파란색 그래프는 감소를 보이지 않았으나 CXCR4 의 반응을 나타내는 빨간색 그래프는 크게 감소하였다. 보라색 그래프도 약간

감소한 모습을 보였다. **c**, **(a)**의 실험 전 30 분동안 GPCR-X3 선택적 antagonist 인 X3 antagonist 를 처리하였다. 그 결과 빨간색 그래프는 감소를 보이지 않았으나 GPCR-X3 의 반응을 나타내는 파란색 그래프는 검은색 그래프 수준까지 감소하였다. Synergistic effect 를 나타내는 보라색 그래프도 매우 크게 감소하여 빨간색 그래프 수준까지 줄어들었다. **d**, **(a)**의 실험 전 30 분동안 CXCR4 의 선택적 antagonist 인 AMD3100 과 GPCR-X3 선택적 antagonist 인 X3 antagonist 를 동시에 처리하였다. 그 결과 모든 그래프가 검은색 그래프 수준까지 줄어드는 것을 관찰하였다.

IV. 고찰

본 연구에서는 다양한 실험기법을 사용하여 CXCR4와 GPCR-X family 사이에 일어나는 상호작용을 알아내고자 하였다. BiFC 실험 결과 기존에 보고되었던 CXCR4의 homomer 형성을 확인할 수 있었고, GPCR-X2와 GPCR-X3가 각각 homomer를 형성하는 것도 밝힐 수 있었다. 이와 반면 GPCR-X1은 다른 연구에서 이미 보고된 바 있었던 것처럼 homomer를 형성하지 않고 단일체 형태로 존재함을 확인하였다 (M. et al. 2006). GPCR-X family 끼리나 CXCR4-GPCR-X family의 이형 중합체 형성은 연구된 바가 없었는데, BiFC 실험으로 는 양상의 차이는 있었지만 모두 positive한 결과를 얻을 수 있었다. 양상은 크게 두 가지로 나뉘었는데, GPCR-X2가 관여하지 않는 상호작용은 모두 막 표면에서 형광을 관찰할 수 있었으며 GPCR-X2가 관여하는 상호작용은 모두 세포막 내부에서 granule의 형태로 관찰되었다. 이와 같은 현상은 GPCR-X2가 다른 연구에서 보고되었던 세포막 내에서의 localization과 관련이 있을 것으로 예상할 수 있다 (G. et al. 2016).

특이적인 localization을 나타내고 있는 이러한 GPCR-X2는 이 수용체에 선택적으로 작용하는 antagonist를 처리하였을 때 농도와 시간에 비례하여 세포막 표면에서의 발현을 유지하는 것을 확인하였다. 또한 GPCR-X2가 antagonist에 의해 세포 막 표면에서의 발현되었을 때 각각 CXCR4, GPCR-X1, GPCR-X3와의 BiFC 결과 역시 세포 막 표면에 나타나는 것을 확인할 수 있었다. GPCR-X2가 CXCR7과 같이 지속적으로 재사용되는 수용체인지, 아니면 internalize 된 후 분해되면서 계속해서 새로운 수용체를 생산하여 막으로 보내는지의 구분에는 이보다 좀 더 체계적인 실험이 필요하겠다.

이러한 차이는 BRET에서도 나타났는데, CXCR4-GPCR-X1, CXCR4-GPCR-X3 사이의 에너지 전달 패턴이 비슷한 모습을 보였던 반면 CXCR4-GPCR-X2는 앞의 패턴과 비교하여 조금 더 감소된 모습을 보였는데 이는 CXCR4가 주로 세포의 표면에서 발현하고 GPCR-X2는 그렇지 않기 때문에 상호작용할 수

있는 절대적 양의 차이에서 비롯되었으리라 예상한다. 그리고 CXCR4와 GPCR-X1, GPCR-X3 사이의 BRET 세기는 VN173, VC155를 어느 쪽 GPCR에 연결하느냐에 따라 달라지는 모습을 보였는데, 이러한 차이는 CXCR4와 GPCR-X family 외의 다른 GPCR 사이에서도 관찰되는 것으로 미루어 보아 GPCR이 상호작용하는 topology에 의한 차이 때문에 발생할 수 있다고 생각한다.

CXCR4와 GPCR-X family 사이의 상호작용은 co-internalization assay에서 다시 한 번 확인할 수 있었다. 수용체 특이적 리간드가 아닌데도 불구하고 두 가지 GPCR을 co-expression 시켰을 때 GPCR-X의 리간드에 의해 CXCR4/GPCR-X1, CXCR4/GPCR-X3 모두 internalize 되었기 때문이다. 다만 확연한 차이를 보였던 것은 GPCR-X1, GPCR-X3의 리간드에 의해서는 CXCR4가 internalize 되었으나 CXCR4의 리간드인 CXCL12에 의해서는 CXCR4만 internalization이 일어났다는 것이다. 이런 현상은 아마도 CXCL12에 의해서 CXCR4의 conformation에 변화가 일어나 GPCR-X family와 함께 internalize 되지 못하였거나 co-internalization을 주도하는 것이 GPCR-X로부터의 방향일 수 있다고 예상하고 있다. GPCR-X2의 경우에는 앞서 논의했던 것처럼 단독 발현시에도 localization이 다른 GPCR들과 달리 세포 내부이기 때문에 co-internalization을 관찰하기 어려웠다. GPCR-X2 특이적 antagonist를 처리하여 세포 표면으로의 발현을 유지키는 것은 가능하지만 이럴 경우 이미 agonist가 작용할 리간드 부위에 결합한 상태이므로 더욱이 실험에 적합하지 않았다. 따라서 후속 연구를 계속하려면 유전자 수준에서의 조작을 통하여 리간드 작용 부위에 영향을 주지 않으면서도 지속적인 internalization은 막을 수 있는 방법을 찾아야 할 것이다. 또한 co-internalization assay 전반에 걸쳐서는 상호작용할 GPCR들의 발현에 대한 정량을 진행하지는 않았기 때문에 1:1로 발현시킴으로써 동일한 확률의 접촉 기회를 가질 수 있도록 한다면 더욱 실험의 신뢰도를 높

일 수 있을 것이다.

Cal-520[®]을 이용한 MDA-MB-231 세포 내 칼슘 농도 변화의 측정은 중합체 형성시 수용체의 신호 전달에서 큰 상승작용을 나타내고 있음을 알 수 있는 실험이었다. CXCR4만을 발현시킨 세포에서는 CXCL12 단독 처리나 GPCR-X의 agonist와 함께 처리한 것이나 별다른 차이가 없었던 반면 GPCR-X만을 발현시킨 실험군에서는 agonist X의 단독 처리한 결과값보다 CXCL12와 함께 처리한 실험군의 결과값이 더 높게 나타났는데, 이는 다른 연구에서 여러번 보고되었던 바와 같이 MDA-MB-231 세포가 CXCR4를 endogenous하게 발현하고 있기 때문에 그것과 synergistic effect를 나타내었으리라 짐작한다 (Helbig et al. 2003). 두 가지 GPCR을 모두 발현시킨 co-expression 실험군에서도 상승작용의 정도가 GPCR-X1>GPCR-X2>GPCR-X3 순으로 크게 나타났는데, endogenous CXCR4와의 synergy로 예상되는 결과 값 또한 같은 크기순으로 나타났기 때문에 세운 가설과 부합하는 모습을 보였다.

GPCR에 특이적으로 작용하는 antagonist 실험에서는 CXCR4의 antagonist인 AMD3100을 처리하였을 때보다 상대편 GPCR-X의 antagonist를 처리하였을 때 상승작용을 더욱 크게 감소시키는 모습을 보였다. 아직까지 이에 대한 연구가 많이 진행된 바가 없어서 적절한 근거를 찾지는 못하였지만 본 연구에서 진행하였던 co-internalization assay에서도 CXCL12에 의해서는 유도되지 않았던 co-internalization과 다르게 agonist X에 의해서는 유도되는 모습을 보였던 결과와 어느 정도 상응하는 것으로 보인다. 이 결과들을 종합하여 보면 CXCR4와의 상호작용을 주도하는 것이 GPCR-X로부터의 방향이라는 가설에 좀 더 힘을 실어줄 수 있으리라 보고 있다.

본 연구는 CXCR4와 GPCR-X family 간의 중합체 형성과, 이에 따른 상호작용 중에서도 세포 내 신호 전달 방법의 한 가지인 칼슘 이온 농도의 변화에 초점을 맞추어 진행하였기 때문에 실질적으로 세포에서 나타나는 생리학적

변화에 대해서 후속 연구가 필요하다. 또한 간접적인 단백질-단백질 상호작용 측정인 BiFC나 BRET 외에도 직접적으로 관찰이 가능한 Co-IP를 통해 직관적 방법도 신뢰도를 높일 수 있을 것이다. 마지막으로 본 연구에 사용된 GPCR의 발현 유도 방법은 모두 인위적인 과발현 방법이기 때문에 실제로 CXCR4와 각 GPCR-X family를 endogenous하게 발현하고 있는 세포/조직/실제 환자 케이스를 사용한다면 더욱 확실한 생리학적 변화와 두 GPCR 사이의 상호작용의 의미를 찾을 수 있으리라 생각한다.

기존에는 약 800종에 달하는 GPCR들을 하나씩, 또는 family별로 연구하는 것이 대부분이었고 근래에 들어서야 GPCR heteromerization에 관한 논문들이 많이 발표되고 있지만 아직까지 CXCR4의 heteromerization을 이용한 조절은 보고된 바가 없다. 따라서 중합체 연구는 비단 CXCR4에만 해당되는 것이 아니라 곳곳에서 연구하고 있는 GPCR들을 좀 더 넓은 시각에서 볼 수 있는 계기가 될 것으로 기대한다. 이형 중합체는 형성하는 것만으로 상대방 GPCR의 구조를 변형시켜 리간드가 작용하는 양상을 달라지게 만들기도 한다. 또한 서로 다른 G 단백질을 recruit하는 GPCR들의 경우 이형 중합체를 이루었을 때, 홀로 존재할 때와는 전혀 다른 방향으로 signaling 전달이 전개될 수도 있다. 따라서 GPCR 연구에서 기존에는 설명하지 못했던 현상들을 이합체 또는 중합체를 통하여 그에 대한 이해도를 더욱 높일 수 있으리라 기대한다.

V. 참고 문헌

참고 문헌

- Viola A, Luster AD. 2008. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**: 171-197.
- Balkwill F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* **4**: 540–550.
- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* **184**: 1101-9
- Liberman J, Sartelet H, Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Coulon A, Nyalendo C, et al. 2012. Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 Axis in the Malignant Progression of Human Neuroblastoma. *PLoS ONE* **7**: e43665.
- De Clercq E. (2008) The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol* **77**: 1655-64
- Dai S. et al. (2010) Chronic AMD3100 antagonism of SDF-1 α -CXCR4 exacerbates cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **49**: 587-97
- Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Mañes S, Martínez-A C. (2001) Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* **19**: 397-421
- Karla K.V. Haack and Nael A. McCarty. 2011. Functional Consequences of GPCR Heterodimerization: GPCRs as Allosteric Modulators. *Pharmaceuticals (Basel)*. **4**: 509–523
- N. 2005.
- J. et al. 2016.
- M. et al. 2007.
- D. et al. 2000.
- M. et al. 2006.

- M. et al. 2007.
- R. et al. 2008.
- S. et al. 2000.
- L. et al. 2006.
- V. Srinivasa Rao, K. Srinivas, G. N. Sujini, and G. N. Sunand Kumar. 2014. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics* **2014**: 147648
- Miller KE, Kim Y, Huh WK, Park HO. 2015. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *J Mol Biol* **427**: 2039-2055
- Natalia Alonso, Natalia Fernandez, Cintia Notcovich, Federico Monczor, May Simaan, Alberto Baldi, J. Silvio Gutkind, Carlos Davio, and Carina Shayo. 2013. Cross-desensitization and cointernalization of H1 and H2 histamine receptors reveal new insights into histamine signal integration. *Mol Pharmacol* **83**: 1087-98
- Borroto-Escuela DO, Flajolet M, Agnati LF, Greengard P, Fuxe K. 2013. Bioluminescence resonance energy transfer methods to study G protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes. *Methods Cell Biol* **117**: 141-64
- Kocan M., Pflieger K.D.G. 2011. Study of GPCR-Protein Interactions by BRET. *Methods Mol Biol* **746**: 357-71
- David E.Clapham. 2007. Calcium Signaling. *Cell* **131**: 1047-1058
- Princen K1, Hatse S, Vermeire K, De Clercq E, Schols D. 2010. Evaluation of SDF-1/CXCR4-induced Ca²⁺ signaling by fluorometric imaging plate reader (FLIPR) and flow cytometry. *Cytometry A*. **51**: 35-45
- Lock JT, Parker I, Smith IF. 2015. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells. *Cell Calcium* **58**: 638-48
- Imre Kovesdi, Susan J. Hedley. 2010. Adenoviral Producer Cells. *Viruses* **2**: 1681–1703
- Helbig G, Christopherson KW, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H. 2003. NF- κ B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis

by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 21631-21638.

Jae-Yeon Jeong, Hyung-Soon Yim, Ji-Young Ryu, Hyun Sook Lee, Jung-Hyun Lee, Dong-Seung Seen and Sung Gyun Kang. 2010. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and Environmental Microbiology* **78** 5440-5443

G. et al. 2016.

Abstract

Changseong Park

School of biological science

The Graduate School

Seoul National University

The chemokine CXCL12, also known as stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), does a critical part in normal cell migration and homing by interacting with the G-protein coupled receptor CXCR4. Migration and homing of cells are also known to be the key factor in cancer metastasis. According to previous researches, CXCR4 and its ligand CXCL12 are over-expressed in many types of cancers and their over-expression contributes to continuing proliferation, migration, and invasion through multiple signaling pathways. Therefore, there have been numerous attempts to directly suppress the CXCR4 activity, only to trigger adverse side effects like cardiac dysfunction.

As an alternative, our lab has paid attention to GPCR heteromerization, in order to take advantage of (suppressing) modifying the function of CXCR4 with its heteromer-counterpart as an allosteric modulator. Previous study done in our lab using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay has discovered multiple CXCR4 interactor candidates, including neuropeptide-X3 receptor (GPCR-X3). Based on this finding, whole GPCR-X family, composed of three members (GPCR-X1, GPCR-X2, and GPCR-X3), were tested in this study. Even though there were some differences in detail, all three receptors showed positive results in the BiFC assay. Results from the following assay, which is to examine the co-internalization pattern of two GPCRs, corresponded to the ones from the BiFC assay. GPCR-X-specific ligands naturally induced the

internalization of GPCR-X, but CXCR4 was found to be internalized in a same pattern as well, simultaneously. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay re-confirmed the formation of heteromers between CXCR4 and GPCR-X family. Especially, we used Cal-520[®] as a measure to visualize and quantify the calcium mobilization in cells expressing either or both CXCR4 and GPCR-X. When co-activated, the calcium level showed a significant increase in quantity. CXCR4- and GPCR-X-selective antagonists antagonized the effects when treated. Thus, our findings suggest that CXCR4 and GPCR-X family interact, form a heteromer, and trigger significant changes in cell signaling pathways. Therefore, it implies that using GPCR heteromer-counterpart can be promising alternative to suppress the CXCR4 activity, which can avoid detrimental side effects.

Keywords: CXCR4, CXCL12, GPCR heteromerization, BiFC, Co-internalization assay